

**DIE CHLOROPLASTENFLUORESZENZ
ALS KENNGRÖSSE IN DER BIOINDIKATION.**

Mikroskopfluorimetrie von
Randeffekten und SO_2 -Wirkungen bei Moosen.

Dissertation
zur Erlangung des
akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

vorgelegt dem
Fachbereich Biologie/Chemie
der Universität Bremen

von
Siegfried Schiele
aus Bremen

1985



**DIE CHLOROPLASTENFLUORESZENZ
ALS KENNGRÖSSE IN DER BIOINDIKATION.**

Mikroskopfluorimetrie von
Randeffekten und SO_2 -Wirkungen bei Moosen.

Dissertation
zur Erlangung des
akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

vorgelegt dem
Fachbereich Biologie/Chemie
der Universität Bremen

von
Siegfried Schiele
aus Bremen

DIE CHLOROPLASTEFLUORESCENZ
ALS KENNZEICHEN IN DER BIOINDIKATION
Mikrobiologische Untersuchung von
Pflanzen und SO₂-Wirkungen bei Moosen

Dissertation
zur Erlangung des
akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

Tag der mündlichen Prüfung : 18.1.1985

Gutachter : 1. Prof.Dr.K.H.KREEB

2. Prof.Dr.H.SCHWEGLER

- Meiner Familie gewidmet -

1.	Einleitung	1
2.	Die Bedeutung der Familie	2
3.	Die Aufgaben der Familie	3
4.	Die Entwicklung der Familie	4
5.	Die Probleme der Familie	5
6.	Die Zukunft der Familie	6
7.	Die Bedeutung der Familie für die Gesellschaft	7
8.	Die Aufgaben der Familie in der Gegenwart	8
9.	Die Entwicklung der Familie in der Zukunft	9
10.	Die Probleme der Familie in der Zukunft	10
11.	Die Zukunft der Familie in der Gegenwart	11
12.	Die Bedeutung der Familie für die Zukunft	12
13.	Die Aufgaben der Familie in der Zukunft	13
14.	Die Entwicklung der Familie in der Zukunft	14
15.	Die Probleme der Familie in der Zukunft	15
16.	Die Zukunft der Familie in der Zukunft	16
17.	Die Bedeutung der Familie für die Zukunft	17
18.	Die Aufgaben der Familie in der Zukunft	18
19.	Die Entwicklung der Familie in der Zukunft	19
20.	Die Probleme der Familie in der Zukunft	20
21.	Die Zukunft der Familie in der Zukunft	21
22.	Die Bedeutung der Familie für die Zukunft	22
23.	Die Aufgaben der Familie in der Zukunft	23
24.	Die Entwicklung der Familie in der Zukunft	24
25.	Die Probleme der Familie in der Zukunft	25
26.	Die Zukunft der Familie in der Zukunft	26
27.	Die Bedeutung der Familie für die Zukunft	27
28.	Die Aufgaben der Familie in der Zukunft	28
29.	Die Entwicklung der Familie in der Zukunft	29
30.	Die Probleme der Familie in der Zukunft	30
31.	Die Zukunft der Familie in der Zukunft	31
32.	Die Bedeutung der Familie für die Zukunft	32
33.	Die Aufgaben der Familie in der Zukunft	33
34.	Die Entwicklung der Familie in der Zukunft	34
35.	Die Probleme der Familie in der Zukunft	35
36.	Die Zukunft der Familie in der Zukunft	36
37.	Die Bedeutung der Familie für die Zukunft	37
38.	Die Aufgaben der Familie in der Zukunft	38
39.	Die Entwicklung der Familie in der Zukunft	39
40.	Die Probleme der Familie in der Zukunft	40
41.	Die Zukunft der Familie in der Zukunft	41
42.	Die Bedeutung der Familie für die Zukunft	42
43.	Die Aufgaben der Familie in der Zukunft	43
44.	Die Entwicklung der Familie in der Zukunft	44
45.	Die Probleme der Familie in der Zukunft	45
46.	Die Zukunft der Familie in der Zukunft	46
47.	Die Bedeutung der Familie für die Zukunft	47
48.	Die Aufgaben der Familie in der Zukunft	48
49.	Die Entwicklung der Familie in der Zukunft	49
50.	Die Probleme der Familie in der Zukunft	50
51.	Die Zukunft der Familie in der Zukunft	51
52.	Die Bedeutung der Familie für die Zukunft	52
53.	Die Aufgaben der Familie in der Zukunft	53
54.	Die Entwicklung der Familie in der Zukunft	54
55.	Die Probleme der Familie in der Zukunft	55
56.	Die Zukunft der Familie in der Zukunft	56
57.	Die Bedeutung der Familie für die Zukunft	57
58.	Die Aufgaben der Familie in der Zukunft	58
59.	Die Entwicklung der Familie in der Zukunft	59
60.	Die Probleme der Familie in der Zukunft	60
61.	Die Zukunft der Familie in der Zukunft	61
62.	Die Bedeutung der Familie für die Zukunft	62
63.	Die Aufgaben der Familie in der Zukunft	63
64.	Die Entwicklung der Familie in der Zukunft	64
65.	Die Probleme der Familie in der Zukunft	65
66.	Die Zukunft der Familie in der Zukunft	66
67.	Die Bedeutung der Familie für die Zukunft	67
68.	Die Aufgaben der Familie in der Zukunft	68
69.	Die Entwicklung der Familie in der Zukunft	69
70.	Die Probleme der Familie in der Zukunft	70
71.	Die Zukunft der Familie in der Zukunft	71
72.	Die Bedeutung der Familie für die Zukunft	72
73.	Die Aufgaben der Familie in der Zukunft	73
74.	Die Entwicklung der Familie in der Zukunft	74
75.	Die Probleme der Familie in der Zukunft	75
76.	Die Zukunft der Familie in der Zukunft	76
77.	Die Bedeutung der Familie für die Zukunft	77
78.	Die Aufgaben der Familie in der Zukunft	78
79.	Die Entwicklung der Familie in der Zukunft	79
80.	Die Probleme der Familie in der Zukunft	80
81.	Die Zukunft der Familie in der Zukunft	81
82.	Die Bedeutung der Familie für die Zukunft	82
83.	Die Aufgaben der Familie in der Zukunft	83
84.	Die Entwicklung der Familie in der Zukunft	84
85.	Die Probleme der Familie in der Zukunft	85
86.	Die Zukunft der Familie in der Zukunft	86
87.	Die Bedeutung der Familie für die Zukunft	87
88.	Die Aufgaben der Familie in der Zukunft	88
89.	Die Entwicklung der Familie in der Zukunft	89
90.	Die Probleme der Familie in der Zukunft	90
91.	Die Zukunft der Familie in der Zukunft	91
92.	Die Bedeutung der Familie für die Zukunft	92
93.	Die Aufgaben der Familie in der Zukunft	93
94.	Die Entwicklung der Familie in der Zukunft	94
95.	Die Probleme der Familie in der Zukunft	95
96.	Die Zukunft der Familie in der Zukunft	96
97.	Die Bedeutung der Familie für die Zukunft	97
98.	Die Aufgaben der Familie in der Zukunft	98
99.	Die Entwicklung der Familie in der Zukunft	99
100.	Die Probleme der Familie in der Zukunft	100

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. K. H. Kreeb danke ich für die Überlassung des Themas sowie die zahlreichen Diskussionen welche den Fortgang der Arbeit sehr gefördert haben.

Dank ebenfalls an Frau Dr. R. Weinmann für ihre hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Dank auch an die Adresse des Umweltbundesamtes (Berlin), des Forschungsschwerpunktes 'Stabilitätsgrenzen biologischer Systeme' der Universität Bremen und der Stadt Esslingen für ihre großzügigen Sachmittelleistungen durch die die Arbeit erst möglich wurde.

Für die Erledigung sämtlicher Schreibarbeiten bedanke ich mich bei meiner Frau.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	Problemstellung	4
2.	<u>GRUNDLAGEN DER CHLOROPLASTENFLUORESZENZ</u>	6
2.1	Photophysikalische Vorgänge	6
2.2	Modellvorstellungen zur Energieverteilung im Photosyntheseapparat	7
2.3	Definition der Kurvenmerkmale und deren Interpretation	14
3.	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	21
3.1	Pflanzenmaterial	21
3.1.1	Laborkultur	21
3.2	Begasungsanlage	22
3.2.1	Grundlagen	22
3.2.2	Aufbau und Materialien	23
3.3	Fluoreszenzmessungen	25
3.3.1	Das Fluoreszenzmikroskop	25
3.4	Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse	30
4.	<u>VERSUCHE, ERGEBNISSE UND DISKUSSIONEN</u>	32
4.1	Vorversuche	32
4.1.1	Die verschiedenen Formen der Induktions- kurve	32
4.1.1.1	Die phänomenologische Beschreibung der In- duktionskurven, wie sie bei Moosen der Gat- tung <i>Mnium</i> zu beobachten sind	35
4.1.2	Möglichkeiten der Auswertung eines Kurven- zuges vom Typ <i>schnelle Induk- tion</i>	37
4.2	Die Beeinflußbarkeit der Chloroplastenflu- oreszenz durch Randgrößen	41

4.2.1	Vorbemerkungen	41
4.2.2	Dunkelatmungseffekte	43
4.2.2.1	Ergebnisse	43
4.2.2.2	Diskussion	46
4.2.3	Lichtintensität	48
4.2.3.1	Ergebnisse	48
4.2.3.2	Diskussion	51
4.2.4	Dunkelphasen	56
4.2.4.1	Meßprogramm zur Ermittlung der Dunkel- phasendauer	56
4.2.4.2	Ergebnisse	58
4.2.4.3	Diskussion	61
4.2.5	Temperatur	67
4.2.5.1	Methodik	67
4.2.5.2	Ergebnisse	68
4.2.5.3	Diskussion	70
4.2.6	Entwicklungszustand der Moose	76
4.2.6.1	Methode	76
4.2.6.2	Ergebnisse	77
4.2.6.3	Diskussion	79
4.3	Standardmeßbedingungen	83
4.4	Die Beeinflußbarkeit der Chloroplasten- fluoreszenz durch SO_2	84
4.4.1	Methodik	84
4.4.1.1	Vorbereitung zur Begasung	84
4.4.1.2	Fluoreszenzmessung und Kenngrößen	85
4.4.1.3	Regenerationsuntersuchungen	85
4.4.2	Ergebnisse	86
4.4.2.1	Typische Phasen der Begasungswirkung	86
4.4.2.2	Konzentrations-Zeit-Kurven	88
4.4.2.3	Regeneration der Fluoreszenzinduktion	90
4.4.3	Diskussion	92
5.	<u>MODELLÜBERLEGUNGEN ZUR STRUKTUR UND STABILITÄT DES CHLOROPLASTEN</u>	98

5.1	Einleitung und Problemauswahl	98
5.2	Problemformulierung	99
5.3	Modellansatz und Systemeingrenzung	100
5.4	Das System im stationären Milieu	102
5.4.1	Die Stabilität/Instabilität der Climax- Struktur	105
5.5	Das System im veränderlichen Milieu	108
5.5.1	Der Strukturtyp	108
5.5.2	Die Organisation	109
5.6	Diskussion	112
6.	<u>SYNOPSIS</u>	118
7.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	128
8.	<u>LITERATUR</u>	131

Liste der häufig verwendeten Abkürzungen:

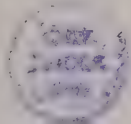
k_D :	strahlungsloser Energieabbau
k_d :	strahlungsloser Energieabbau direkt am Reaktionszentrum
k_F :	Energieabbau durch Fluoreszenz
k_T :	Energietransfer
k_t :	Energietransfer am RZ 2 zurück in das Antennensystem des PS 2 und den LHCP
k_P :	Photochemie
LHCP:	lichtsammelnder Chlorophyll a/b-Protein-Komplex
PS 1:	Pigment-Protein-Komplex 1
PS 2:	Pigment-Protein-Komplex 2
RZ 1:	Reaktionszentrum des PS 1
RZ 2:	Reaktionszentrum des PS 2
PQ: ✓	sekundärer e^- -Akzeptor Plastoquinon
Q:	primärer e^- -Akzeptor Q
F_o :	Fluoreszenz im Merkmal O (Grundfluoreszenz)
F_P :	Fluoreszenz im Merkmal P (Maximumfluoreszenz)
F_S :	Fluoreszenz im Merkmal S (quasi-steady-state-Fluoreszenz)
F_v :	variable Fluoreszenz
$I_{Fl.}$:	Intensität der Fluoreszenzemission

1. EINLEITUNG

Die Kenntnis des Phänomens der Rotfluoreszenz von Chlorophyll-Lösungen bei Belichtung ist schon alt. Dies ist jedenfalls zu vermuten, wenn man in N.J.C. MÜLLER's Handbuch der Botanik aus dem Jahre 1880 die in diesem Zusammenhang gegebenen Literaturhinweise beachtet. MÜLLER beschreibt 1874 aber auch eigene Untersuchungen, die sich mit "... der Beziehung zwischen Assimilation, Absorption und Fluoreszenz im Chlorophyll des lebenden Blattes" beschäftigen. MÜLLER gelingt es dabei vermutlich als erstem, das Lichtphänomen auch am intakten Blattmaterial zu beobachten. Aufgrund seiner Experimente kommt er zu dem bemerkenswerten Schluß, daß "zwischen assimilatorischen Bewegung und der Fluoreszenz eine Wechselwirkung besteht, derart, daß die eine Erscheinung die andere ausschließt".

Der Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und Photosynthese war somit schon früh bekannt. Die raschen zeitlichen Änderungen der Emissionsintensität unmittelbar nach Belichtungsbeginn konnte MÜLLER aufgrund der damals eingeschränkten apparativen Möglichkeiten jedoch noch nicht erkennen. Die Entdeckung dieses Phänomens, heute als Fluoreszenzinduktion oder auch Kautsky-Effekt bekannt, ist H. KAUTSKY zuzuschreiben (KAUTSKY und HIRSCH 1934).

Für die moderne Photosyntheseforschung ist die Fluoreszenzanregung eine wichtige Untersuchungsmethode, mit deren Hilfe es möglich ist, Informationen zur Funktionsfähigkeit der gesamten Photosynthese zu gewinnen. Dementsprechend umfangreich ist die Literatur, welche sich mit diesem Problemfeld befaßt. Ausschließlich die Chlorophyllfluoreszenz zum Thema haben BUTLER (1966), GOVINDJEE und PAPAGEORGIOU (1971), GOEDHEER (1972), PAPAGEORGIOU (1975), LAVOREL und ETIENNE (1977)



sowie BAKER und BRADBURY (1981). Es handelt sich hier z. T. um Arbeiten, welche einen umfassenden Einblick in die Fluoreszenzforschung zu geben vermögen.

Wenn es zutrifft, daß durch die Fluoreszenzinduktion das Funktionieren des Photosyntheseapparates nachgewiesen werden kann, dann liegt es nahe, diese Methode zu bioindikativen Zwecken und auf physiologischer Ebene einzusetzen. Unter Bioindikation sei hier "die Früherkennung von Störungen vor sichtbaren äußeren Schäden" verstanden (KREEB et al. 1981).

Da die meisten Pflanzen ohne spezielle Präparation zur Fluoreszenz angeregt und gemessen werden können, sind mit dieser Methode prinzipiell die Voraussetzungen für ein nichtdestruktives Messen gegeben. Dies ist ein Vorzug, der speziell für die Ökophysiologie von Bedeutung ist, denn nur so kann dem Wesen ökophysiologischer Untersuchungen Rechnung getragen werden (KREEB 1977).

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde ein Fluoreszenzmikroskop verwendet; das heißt, die Meßmethode basiert auf optischen Prinzipien. Die damit verbundene Problematik fordert bekanntermaßen ein Untersuchungsobjekt, welches optisch möglichst dünn ist. Die Wahl fiel, diesen, aber auch andere Punkte betreffend, auf Moose der Gattung *Mni* u m. Diese zeichnen sich durch eine vergleichsweise geringe strukturelle Komplexität aus und genügen so bestens den Gegebenheiten seitens der Meßapparatur. Andere Vorzüge sind darin zu sehen, daß exogen zugeführte Substanzen, aber auch alle sonstigen Umweltfaktoren, schnell und ohne besondere Barrieren überwinden zu müssen, in die unmittelbare Umgebung des Chloroplasten vorzudringen vermögen. Der Chloroplast ist aber

jenes Organell, in dem die Fluoreszenz letztlich entsteht. Moose, aber gleichermaßen Flechten, haben folglich Eigenschaften, welche diese zu sensiblen, Umwelteinflüsse reflektierende Organismen machen (SCHLEE 1977). Speziell über die Eignung von Moosen als Bioindikator wurde schon vielfach berichtet (GILBERT 1968, LEBLANC und DESSLOOVER 1970, DÜLL 1974, WITTENBERGER 1975, FRAHM 1976 u. a.).

Ein pflanzlicher Bioindikator zeigt letztlich immer die Gesamtbelastung am Standort an (KREEB et al. 1981, MÜLLER 1981). Dadurch ist es im allgemeinen schwer möglich, einen bestimmten Faktor für die Reaktion eines Organismus verantwortlich zu machen. Einfacher sind diesbezüglich Laboruntersuchungen mit Testpflanzen. Dort können auch bei ökophysiologischen Untersuchungen die Randbedingungen weitgehend kontrolliert werden. Aus der Situation standardisierter Bedingungen mag es deshalb gelingen, Beziehungen zwischen Ursache und Wirkung herzustellen.

Die Wirkungen von SO_2 auf den pflanzlichen Organismus sind gut bekannt und vielfach beschrieben worden (JÄGER und KLEIN 1979). Es ist dies ein Grund, weshalb wir uns zur Kenntnis des bioindikativen Wertes der Fluoreszenz dieses Schadstoffes bedient haben. Allerdings nur sehr wenige Untersuchungen zur SO_2 -Problematik beschäftigen sich auch mit der Chloroplastenfluoreszenz, wie sie im Verlauf der Arbeit auch genannt werden soll (ARNDT 1974, SHIMAZAKI und SUGAHARA 1980, vergleiche auch ARNOLD und KREEB 1976). Es mag deshalb umso interessanter sein, auf diesem Gebiet einen Beitrag leisten zu können.

Die Beschreibung von Zustandssituationen eines biologischen Systems ist ein zentrales Anliegen in der Bioindikation. Die Vielfalt der möglichen Betrachtungsweisen zeichnet jedoch meist eher ein uneinheitliches denn ein einheitliches Bild.

In dieser Situation versucht ein systemtheoretischer Ansatz von SCHWEGLER (1981) mit seinen ordnenden Prinzipien eine Hilfe zu sein. Damit soll die Möglichkeit gegeben sein, auch die unterschiedlichsten biologischen Systeme hinsichtlich ihrer Zustandssituation und deren Stabilität einheitlich beschreiben zu können. Die Arbeit befaßt sich in einem abschließenden Teil mit der Anwendung der Theorie auf den Chloroplasten, in der Absicht, ein abstraktes Modell ausgewählter Zustandssituationen konstruieren zu können.

1.1 Problemstellung

Die im Zusammenhang mit Bioindikation sich stellenden Fragen nach dem geeigneten pflanzlichen Material und der Kenngröße hinsichtlich des Schadenskriteriums waren bereits zu Beginn der Arbeit soweit geklärt, als festgelegt war, einschichtige Moosblätter als Material und die Chloroplastenfluoreszenz als Kenngröße zu verwenden.

Unbekannt, und deshalb als Problemstellung formuliert, waren die Fragen:

- Wie sieht die Fluoreszenzinduktion bei Moosblättern aus?
- Ist es ein reproduzierbares Signal und was ist zu beachten, um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten? D. h., welche Standardisierungen hinsichtlich der Meßvorgänge sind zu treffen?
- Wie verändert sich die Fluoreszenzinduktion bei SO₂-begasten Moosblättern? Welche Interpretationsmöglich-

keiten hinsichtlich der Wirkung sind anhand des veränderten Signals gegeben?

- Inwieweit läßt sich mit Hilfe des Fluoreszenzsignals eine Zustandsbeschreibung im Sinne der Theorie von SCHWEGLER (1981) geben?

2. GRUNDLAGEN DER CHLOROPLASTENFLUORESCENZ

2.1 Photophysikalische Vorgänge

Es ist heute eine allgemein akzeptierte Vorstellung, daß die Photosynthesepigmente die Umwandlung von Licht in chemisch speicherbare Energie realisieren. Die Absorption eines Photons geeigneter Wellenlänge bewirkt den Übergang eines sogenannten π -Elektrons des Chlorophyllmoleküls aus dem Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand, dessen Niveau von der Energie des absorbierten Photons abhängt. Durch Blaulichtabsorption wird der S_2 -, durch Rotlicht der S_1 -Zustand erreicht. Die Verweildauer der Elektronen im S_2 -Zustand ist mit 10^{-12} s derart kurz, daß deren Energie bei der Rückkehr in den S_1 -Zustand ausnahmslos als Wärme frei wird.

Der S_1 -Zustand ist mit einer Lebensdauer von 10^{-9} s sehr viel stabiler, so daß bei der Rückkehr in den Grundzustand mehrere dissipierende Prozesse miteinander konkurrieren können. Es sind dies die Vorgänge des strahlungslosen Energieabbaus (k_D), des Energieabbaus durch Emission von Fluoreszenz (k_F) und des Transfers von Energie auf benachbarte Chlorophyllmoleküle (k_T). Bei erfolgreichem Transfer zu einem Reaktionszentrum kann auch eine Ladungstrennung erfolgen; dies ist dann ein photochemischer Vorgang (k_P). Welcher der energieabbauenden Vorgänge gerade am wahrscheinlichsten ist, hängt vom Zustand des Pigmentträgersystems ab. Im intakten Chloroplasten sind die Pigmente zu Kollektiven assoziiert, die sich durch einen höchst effizienten Energietransport kennzeichnen, so daß die Wahrscheinlichkeit des strahlungslosen Abbaus und der Fluoreszenz recht gering ist.

2.2 Modellvorstellungen zur Energieverteilung im Photosyntheseapparat

Bei Betrachtung der Pigmentsysteme PS 1 und PS 2, die durch eine Elektronentransportkette miteinander verbunden sind (Z-Schema), wird für den Fall eines maximalen Elektronentransportes eine gleichmäßige Energieverteilung auf beide Systeme gefordert. PS 1 und PS 2 haben jedoch unterschiedliche Absorptionseigenschaften, so daß nur dann maximaler Elektronentransport vorausgesetzt werden kann, wenn Wellenlängen vorhanden sind, welche das PS 1 und PS 2 gleichermaßen gut anregen. Die Praxis zeigt jedoch, daß die Quantenausbeute über weite Bereiche des Spektrums von der Wellenlänge unabhängig ist. Dies kann aber nur bedeuten, daß es einen Mechanismus gibt, mit Hilfe dessen bei unterschiedlicher Anregung der beiden Pigmentsysteme eine Neuverteilung der Energie und damit ein neues Gleichgewicht in der Anregung der beiden Photosysteme entsteht. MURATA (1969) sowie BONAVENTURA und MYERS (1969) haben unabhängig voneinander nachgewiesen, daß tatsächlich die Aufteilung der Lichtmenge einer bestimmten Wellenlänge zwischen den Photosystemen unterschiedlich sein kann.

PS 1 und PS 2 sind nicht die einzigen Pigment-Protein-Komplexe in der Thylakoidmembran. Im Zusammenhang mit den Vorstellungen zur Energieverteilung ist es notwendig, als weitere wichtige Membrankomponente, den lichtsammelnden Chlorophyll a/b-Protein-Komplex (LHCP) zu nennen (THORNER 1975). Der LHCP ist eng verknüpft mit dem PS 2 (THORNER und HIGHKIN 1974, THORNER und BARBER 1979, ANDERSON 1980, ANDERSON und ANDERSSON 1982); seine ausschließliche Aufgabe ist es, das ankommende Licht zu sammeln und den beiden Pigmentsystemen zuzuführen. Die Eigenschaft photochemisch wirksam zu sein, wie dies beim PS 1

und PS 2 der Fall ist, fehlt dem LHCP.

Die Vorstellungen zur Energieverteilung im Photosyntheseapparat, wie sie von BUTLER und KITAJIMA (1975 a, b) im Tripartite-Modell (siehe auch BUTLER 1978, 1979) aufgezeigt werden, gehen demgemäß auch von den drei Pigment-Protein-Komplexen LHCP, PS 1 und PS 2 aus.

Der Weg der Lichtenergie in den Pigment-Protein-Komplexen kann nun gemäß Modellvorstellungen in vereinfachter Form folgendermaßen beschrieben werden (Abb. 1).

Entsprechend der Wellenlänge werden von den drei Komplexen unterschiedliche Lichtmengen absorbiert. BUTLER (1978) nennt die Lichtfraktionen α , β und γ , wobei α für den Lichtanteil steht, welcher vom PS 1, β für jenen, der vom PS 2 und γ für den, der vom LHCP absorbiert wird; die Lichtfraktionen addieren sich zu 1 ($\alpha + \beta + \gamma = 1$). Aufgrund des engen Kontaktes zwischen dem LHCP und dem PS 2 ist zwischen beiden Komponenten ein freies Zirkulieren der Energie möglich. Vom PS 2-Antennen-Chlorophyll gelangt die Energie zum Reaktionszentrum (RZ 2), wo Photochemie, d. h. Ladungstrennung, stattfinden kann ($\text{RZ } 2^* \text{ Q} \longrightarrow \text{RZ } 2^+ \text{ Q}^-$). Treffen die Excitonen auf ein inaktives Zentrum $\text{RZ } 2^+ \text{ Q}^-$, so kann keine Photochemie stattfinden und die Energie wird entweder zurück ins PS 2 transferiert (k_t) oder aber strahlungslos direkt am RZ 2 (k_d) abgebaut. Im Falle eines Rücktransportes der Energie in das PS 2 erhöht sich dort die Excitonendichte und damit wiederum die Wahrscheinlichkeit der Energiezirkulation zwischen dem LHCP und dem PS 2. Dem Modell entsprechend hat die Energie nun die Möglichkeit, ein anderes PS 2 mit einem reaktionsbereiten RZ 2 zu suchen, oder aber es erfolgt ein Transfer zum PS 1 (k_T). Letzterer Vorgang ist auch unter dem Begriff Spillover bekannt. Da die Energie einerseits zwischen dem LHCP und dem PS 2 zirkulieren kann, andererseits aber der Kontakt zwischen den

beiden Komponenten nicht absolut ist, vielmehr zum PS 1 hin ebenfalls "Verbindung" besteht, ist eine Neuverteilung der Energie auf die Pigmentsysteme PS 1 und PS 2 möglich. Unmittelbar am PS 1 ankommende Energie wird ausschließlich in einer Richtung, nämlich zum Reaktionszentrum (RZ 1) hin, transportiert.

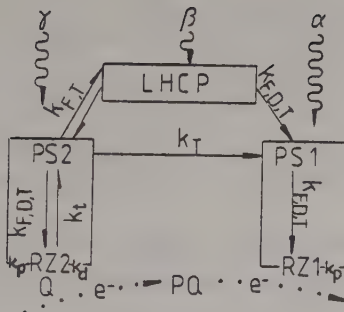


Abb. 1: Modellvorstellungen zum Energietransfer in und zwischen den Pigment-Protein-Komplexen.
 α , β , γ : Lichtanteile, welche vom LHCP, PS 2 bzw. PS 1 absorbiert werden können,
 $\rightarrow$: e^- -Transport,
 ————— $\rightarrow$: Excitonentransfer.

Folgende Vorhersagen bezüglich der Intensität der Photochemie und der Fluoreszenz sind möglich:
Es gelte die Annahme, die Reaktionszentren des PS 2 sind geöffnet bzw. geschlossen. Im ersten Fall würde das bedeuten, daß die Photochemie ihren maximalen Wert erreicht. Das Ereignis der Ladungstrennung ist lediglich von den Bedingungen abhängig, daß Energie vom RZ 2 eingefangen wird und der primäre Akzeptor Q im oxidierten Zustand vorliegt. Der strahlungslose Abbau der Energie sowie die Emission als Fluoreszenz sind dann minimal. Die zu beobachtende geringe Fluoreszenz ist als Grundfluoreszenz (F_0) bekannt (siehe 2.3, S. 14). Im Falle, daß die Reaktionszentren geschlossen sind, findet wegen des reduzierten primären Akzeptors Q keine Ladungstrennung mehr statt; das Einfangen von Energie ist jedoch nach wie vor möglich. Die Photochemie ist in diesem Fall 0, hingegen die Fluoreszenz maximal (F_p). Der Transfer an Energie vom RZ 2 in das PS 2, aber auch die Wahrscheinlichkeit deren strahlungslosen Abbaus direkt am RZ 2, nimmt zu.

Es ist wichtig zu wissen, daß das Modell zwei fluoreszenzlöschende Mechanismen (Quench) unterscheidet. Ein Quench kann vom Antennenchlorophyll des PS 2 ausgehen aufgrund eines erhöhten strahlungslosen Energieabbaus. Dies würde F_0 und F_p gleichermaßen reduzieren, so daß man von einem statischen Quench sprechen kann. Eine reduzierte Fluoreszenz kann aber auch vom RZ 2 direkt herrühren, wenn z.B. der Energietransfer zurück ins Antennenchlorophyll unterbunden und dadurch der strahlungslose Abbau erhöht ist. In diesem Fall wäre nur F_p reduziert, nicht jedoch F_0 , dies ist ein Beispiel für einen dynamischen Quench.

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Bild:

Es liegen drei Pigment-Protein-Komplexe vor. Der LHCP absorbiert ausschließlich Licht und leitet dieses an die beiden Pigmentsysteme PS 1 und PS 2 weiter. Die Pigmentsysteme selbst wirken wie Antennen für die ankommende Energie und transferieren diese zu einem Reaktionszentrum, welches zur Ladungstrennung in der Lage ist. Der Vorgang des Elektronentransportes ist damit eingeleitet. Die Fluoreszenz hat ihren Ursprung im LHCP und PS 2; das PS 1 zeigt bei Raumtemperatur nur eine schwache Fluoreszenz (MATHIES und PAILLOTIN 1981).

Ein weitergehendes Verständnis der Energietransportvorgänge eröffnen Modellvorstellungen zur Wirkung von elektrostatischen Kräften zwischen Membrankomponenten (BARBER 1980, 1982). Die Vorstellungen gehen davon aus, daß die Thylakoidmembran, ähnlich wie andere Biomembranen auch, eine flüssige Lipid-Matrix darstellt (SINGER und NICOLSON 1972). In die Matrix sind u. a. die Pigment-Protein-Komplexe (PS 1, PS 2, LHCP) eingebettet. Ihre Oberflächen sind an der Membranoberfläche exponiert und tragen negative elektrische Ladungen (BARBER 1980, 1982). Weiterhin berücksichtigt das Modell, daß die PS 2- und LHCP-Komplexe in den aneinandergepressten Abschnitten der Granathylakoide vorkommen, hingegen die PS 1-Komplexe vorwiegend in den Randbezirken der Grana- und in den Stromalamellen (BOARDMAN et al. 1978, ANDERSSON und ANDERSON 1980). Aufgrund des hohen Flüssigkeitsgrades der Membran ist für die Pigment-Protein-Komplexe eine freie Beweglichkeit in der Membran möglich (STAEHELIN und ARNTZEN 1979, FORD und BARBER 1980, BARBER et al. 1980).

Das Modell schlägt vor, daß es eine abstoßende Kraftwirkung zwischen den negativ geladenen, exponierten

Oberflächen der Pigment-Protein-Komplexe geben muß; die Lipid-Matrix selbst ist elektroneutral (BARBER 1982). Positive Ladungen in der unmittelbaren Umgebung der Komplexe haben kompensierende Wirkung. Die Distanz zwischen den ähnlich geladenen Membranoberflächen oder Pigment-Protein-Komplexen ist deshalb davon abhängig, wie stark deren negative Ladungen durch positive abgeschirmt werden können. Bei starker Abschirmung können Membranoberflächen oder Partikel sich aufeinander zu bewegen, bei schwacher Abschirmung überwiegt dahingegen die abstoßende Kraft der negativen Ladung, so daß Oberflächen oder Partikel auseinanderdriften.

Experimente mit isolierten Thylakoidmembranen, in denen eine Kationenverarmung induziert wurde, zeigen starke Veränderungen in der Morphologie des Membransystems und der Organisation der Partikel in der Membranebene. Granathylakoide, vorher als geldrollenartig gestapelt erkennbar, verlieren ihre Struktur und sind nicht mehr in Grana- und Stromathylakoide zu unterscheiden. Die veränderte Organisation äußert sich durch eine Neuverteilung der Pigment-Protein-Komplexe derart, daß die ursprünglich deutlich heterogen auf die Grana- und Stromathylakoide verteilten Komplexe nun eher zufallsverteilt in der Membranebene zu liegen kommen (STAEHELIN 1976, STAEHELIN und ARNTZEN 1979). Für die Regulierung des Energietransfers in der Membran scheinen die starken morphologischen Veränderungen ohne Bedeutung zu sein (STAEHELIN und ARNTZEN 1979), zumal diese unter physiologischen Bedingungen deutlich schwächer ausfallen (VERNOTTE et al. 1975). Anders verhält es sich bei den Vorgängen zur veränderten Organisation, wodurch ein erheblicher Einfluß auf den Energietransfer aus-

geübt wird (BARBER 1980).

Aus dem Modell ableitend läßt sich zum Energietransport in den Thylakoiden folgendes sagen:

- a) Bei schwacher elektrostatischer Abschirmung ist die Orientierung der Pigment-Protein-Partikel derart, daß viele LHCP- und PS 2-Komplexe mit solchen des PS 1 assoziiert sind. Dadurch ist die Möglichkeit eines guten Energietransfers (k_T) vom LHCP und PS 2 zum PS 1 gegeben. Die Fluoreszenzemission ist in dieser Situation sehr gering (BARBER 1980).
- b) Im Falle einer guten elektrostatischen Abschirmung verändert sich die Orientierung der Partikel derart, daß nun deutlich weniger LHCP- und PS 2-Komplexe mit solchen des PS 1 Kontakt haben. Der Energietransfer von LHCP und PS 2 zum PS 1 ist unter solchen Bedingungen erschwert und folglich der Energieabbau durch Fluoreszenz entsprechend groß.

Die oben beschriebenen Veränderungen hinsichtlich der Organisation der Partikel in der Membran werden heute mit den sogenannten state 1-state 2-Übergängen in Verbindung gebracht (siehe hierzu 2.3, S. 14 sowie 4.2.4.3, S. 61). Deren physiologische Bedeutung wird darin gesehen, daß hier ein Mechanismus gegeben ist, mit dessen Hilfe das Photosynthesesystem in der Lage ist, trotz veränderter Intensitäten und Wellenlängen des eingestrahltten Lichtes, einen optimalen Elektronenfluß zwischen den beiden Pigmentsystemen PS 1 und PS 2 zu gewährleisten.

2.3 Definition der Kurvenmerkmale und deren Interpretation

Die Grundfluoreszenz (Grundlinie $0 \rightarrow 0$)

Die Grund- oder auch konstante Fluoreszenz ist das erste meßbare Merkmal der Induktionskurve. Sie stellt sich unmittelbar nach dem Einschalten einer Beleuchtung ein und hat ihre volle Intensität innerhalb von 10^{-9} s erreicht. Dies entspricht der Lebensdauer angeregter Chlorophyllmoleküle (PAPAGEORGIOU 1975, RENGGER 1977). Aus apparativen Gründen war es nicht möglich, den gesamten Anstieg der Grundfluoreszenz aufzulösen. Aus diesem Grunde wurde das Intensitätsniveau, wie es sich ergibt, wenn der Lichtweg der Modulatorblende voll geöffnet ist (Dauer bis zur vollständigen Öffnung 250 μ s), als Grundfluoreszenz definiert (siehe 4.1.1.1, S. 35).

Die Grundfluoreszenz hat ihren Ursprung im Chlorophyll a des lichtsammelnden Chlorophyll-Protein-Komplexes (LHCP) sowie des assoziierten Antennensystems PS 2 (BUTLER und KITAJIMA 1975 a, KITAJIMA und BUTLER 1975). Die Reaktionszentren (RZ 1 und RZ 2) zeigen keine meßbare Lichtemission (BUTLER 1978) und die Fluoreszenz des PS 1 ist bei Raumtemperatur nur sehr gering (MATHIES und PAILLOTIN 1981). Die Grundfluoreszenz entsteht, wenn die anregende Energie nicht innerhalb der Lebensdauer des ersten Singulettzustandes auf ein offenes Reaktionszentrum trifft (BUTLER 1978) oder wenn dieses geschlossen ist. Die Intensität der Grundfluoreszenz ist konstant und verändert sich bei intakten Pflanzen im Verlauf einer Belichtung im allgemeinen nicht (siehe jedoch 4.2.4, S. 56).

Der 1. Anstieg ($O \rightarrow I$):

Richtig wäre es, hier von einem zweiten Anstieg zu sprechen, denn ein erster wurde bereits durch die Grundfluoreszenz vorweggenommen. Da der $O \rightarrow I$ -Anstieg jedoch den variablen Teil der Fluoreszenz einleitet, ist der Begriff 1. Anstieg wiederum doch eindeutig.

Zur Entstehung der variablen Fluoreszenz von O nach I können mehrere Vorgänge beitragen:

- a) Mit einer Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von 0,2 ms (WITT 1971) wird in vier Schritten ($S_0 - S_4$) der wasserspaltende Komplex aktiviert (DELOSME 1971, JOLIOT und JOLIOT 1971, RADMER und KOK 1973). Während dieser Aktivierungsphase kommt es zu einer Inaktivierung der Reaktionszentren des PS 2, was als Ursache für eine schnelle Zunahme der Fluoreszenz gesehen werden kann.
- b) Durch eine fortschreitende Reduktion des primären Akzeptors Q (DUYSENS und SWEERS 1963) wird das Verhältnis Q/Q^- immer kleiner, so daß auch dies Anlaß zur Anhäufung inaktiver Reaktionszentren ist.
- c) Mit einer Halbwertszeit von 20 ms (WITT 1975) ist der Elektronenübergang vom Plastoquinon zum Cytochrom f der langsamste Schritt in der Elektronentransportkette. Dies führt trotz eines im Vergleich zu Q größeren PQ-Pools (AMESZ 1977, GOLBECK et al. 1977) zu einer Anhäufung reduzierter Plastoquinonmoleküle. Diese Vorgänge werden gleichfalls durch eine Zunahme der variablen Fluoreszenz angezeigt (LAVERGNE 1974, MOHANTY und GOVINDJEE 1974, PAPAGEORGIOU 1975).

Der 1. Anstieg ist in seiner frühen Phase rein photochemischen Ursprungs und deshalb vom Produkt aus Intensität des anregenden Lichtes und der Dauer der Einstrahlung abhängig (DELOSME 1967). Im weiteren Verlauf des Anstieges setzt jedoch eine thermisch-chemische Reaktion ein, in der Q durch PQ reoxidiert wird.

Entsprechend der Bedingungen bezüglich der Vorbelichtung des Objektes (DOSCHEK und KOK 1972) kann der 1. Anstieg entweder als sigmoidale oder exponentielle Form beobachtet werden (MORIN 1964, DELOSME 1967). Erstere wird von LAVOREL und JOLIOT (1972), JOLIOT et al. (1973) und LAVOREL (1973) als das Ergebnis eines Energietransfers zwischen PS 2-Einheiten gedeutet (PAILLOTIN 1976, BOWES und HORTON 1982). Ein exponentieller 1. Anstieg wird dagegen sowohl mit einem Mg^{2+} - und anderem Kationen-efflux aus dem Thylakoidinnenraum (BARBER et al. 1974, BARBER 1976, BARBER 1982, BUTLER 1977, 1978, KRAUSE 1977, PORTIS et al. 1976) als auch einer LHCP-Phosphorylierung (HORTON und BLACK 1981, 1982, HAWORTH et al. 1982, KYLE et al. 1982) in Verbindung gebracht. In beiden Fällen soll die Verteilung der Lichtenergie zwischen den beiden Pigmentsystemen zugunsten des PS 1 erfolgen.

Nach KYLE et al. (1982) und HAWORTH et al. (1982) bewirkt die LHCP-Phosphorylierung u. a. eine Trennung assoziierter PS 2-Einheiten, so daß zwischen diesen ein Energietransfer unterbunden wird.

Die 1. Fluoreszenzdepression (I $\rightarrow$ D):

Meistens ist dieses Kurvenmerkmal nicht als eine echte Intensitätsabnahme, sondern nur als eine etwas verlangsamte Zunahme zu beobachten (siehe Abb. 5 b). Am deutlichsten tritt das Merkmal unter anaeroben Bedingungen zutage (Abb. 6d)

(KAUTSKY et al. 1960, MUNDAY JR. und GOVINDJEE 1969 a, b, FRANCK et al. 1969, SCHREIBER 1971), ist aber auch bei Chloroplasten im aeroben, vorbelichteten Zustand zu sehen (JENNINGS und FORTI 1975, MOHANTY et al. 1971, SCHREIBER und VIDAVER 1976 a, b). Ein gut ausgebildetes I - D-Merkmal ist auch bei intermittierender Anregung zu beobachten, wo jeder Lichtimpuls als Vorbelichtung zu werten ist (MUNDAY JR. und GOVINDJEE 1969 a).

Für die Entstehung dieses Kurvenmerkmals werden von verschiedenen Autoren unterschiedliche Vorgänge verantwortlich gemacht:

- a) Im Verlauf der Belichtung produziert die Aktivität des PS 1 Elektronenlücken in Richtung des Plastoquinon-Pools, was zu einer zeitweise verstärkten Reoxidation der Elektronenakzeptoren auf der PS 2-Seite führt (MUNDAY JR. und GOVINDJEE 1969, JENNINGS und FORTI 1975).
- b) Ein erhöhter Energietransfer zugunsten des PS 1 (Spillover) intensiviert die PS 1-Aktivität und führt zu dem in a) beschriebenen Effekt (SCHREIBER und VIDAVER 1976 a, b). Nach AOKI und KATOH (1982) kann der I - D-Dip als ein qualitativer Hinweis zum Redoxzustand des PQ-Pools gewertet werden.

Die Zunahme der Fluoreszenzintensität bis zum Maximum P
(D —→ P):

Im weiteren Belichtungsverlauf kommt es wegen Erschöpfung der PS 1-Akzeptoren zu einer erneuten Anhäufung reduzierter Akzeptoren des PS 2 (DUYSENS und SWEERS 1963, MUNDAY JR. und GOVINDJEE 1969 a, b, LAVERGNE 1974). Dies führt zur raschen Zunahme der Fluoreszenz bis zum Maximum P. Die Intensität

der Fluoreszenz im Merkmal P muß jedoch nicht unbedingt der potentiellen maximalen Fluoreszenz entsprechen. Durch Zugabe von DCMU (DELOSME 1967, JOLIOT und JOLIOT 1971, ETIENNE 1974), NaDithionit (VERNOTTE et al. 1979, JENNINGS und FORTI 1975) oder aber durch hohe Lichtintensitäten (VERNOTTE et al. 1979, BRADBURY und BAKER 1981) kann der Akzeptorpool des PS 2 weitgehend reduziert werden, so daß nach solchen Behandlungen eine deutlich erhöhte Intensität im Merkmal P beobachtet werden kann.

Die Abnahme der Fluoreszenz bis zum Merkmal S (P → S):

Der primären Energiekonservierung durch Ladungstrennung folgt eine sekundäre durch den Aufbau eines Protonengradienten quer zur Thylakoidmembran (WALZ et al. 1974, JUNGE und AUSLÄNDER 1974). Die Membran hat dann einen energiereichen Zustand eingenommen, der unter dem Namen HES bekannt ist, was als Abkürzung für den englischen Begriff High Energy State steht (IKEHARA und NISHIMURA 1973, KRAUSE 1973, BARBER 1976). Die Abnahme der Fluoreszenz im HES wird durch mehrere Vorgänge verursacht:

- a) Der Protonengradient durch die Thylakoidmembran bewirkt eine verstärkte thermale Inaktivierung der Energie am PS 2 (BRIANTAIS et al. 1979, KRAUSE et al. 1983).
- b) Der H^+ -Influx wird kompensiert durch einen Mg^{2+} -Efflux (KRAUSE 1974, BARBER 1976) und verursacht eine veränderte räumliche Anordnung der PS 1-, PS 2- und LHCP-Partikel zueinander (STAEHELIN 1976, STAEHELIN und ARNTZEN 1979), so daß ein erhöhter Energietransfer zugunsten des PS 1 (Spillover) stattfinden kann (BUTLER 1978, STEINBACK et al. 1979).

- c) Der in b) beschriebene Vorgang hat eine erhöhte PS 1-Aktivität zur Folge, mit der Konsequenz einer verstärkten Reoxidation des PQ-Pools (LAVERGNE 1974, VERNOTTE et al. 1979, BRADBURY und BAKER 1981).

Die Fluoreszenz in den Merkmalen S $\rightarrow$ M $\rightarrow$ T:

Dem Fluoreszenzabfall bis zum Merkmal S folgt gelegentlich ein erneutes, wenn auch kleineres, Maximum M. Danach geht die Fluoreszenz, abgesehen von schwachen Fluktuationen, in einen stationären Zustand (steady state) über. An dieser, auch als second-wave bezeichneten Phase, sind mehrere gleichzeitig ablaufende Vorgänge beteiligt. Es ist bis heute nicht vollständig gelungen, die Bedeutung der einzelnen Faktoren für diese Phase getrennt zu erfassen. So ist die Reoxidation des PQ- und Q-Pools (BAKER und BRADBURY 1981, BRADBURY und BAKER 1981) ebenso für eine langsame Fluoreszenznabnahme verantwortlich, wie die Bildung eines energetisierten Membranzustandes (KRAUSE 1973, KRAUSE et al. 1981). Die auf das Merkmal S folgenden Intensitätsschwankungen von M bis T deuten wegen ihrer CO_2 -Abhängigkeit auf die Beteiligung des CO_2 -Fixierungsmechanismus hin (SLOVACEK und BANNISTER 1973, BARBER et al. 1974, SOKOLOVE und MARSHO 1977, WALKER 1981, GARAB et al. 1983).

Die langsame, Minuten dauernde, Abnahme der Fluoreszenzintensität auf ein stationäres Niveau T wird mit Vorgängen in Verbindung gebracht, im Verlauf derer die Thylakoidmembran eine Energieneuverteilung zugunsten des PS 1 vornimmt. Es handelt sich dabei um sogenannte state 1-state 2-Übergänge.

Die state 1-state 2 bedingte Abnahme der Fluoreszenz:

BONAVENTURA und MYERS haben 1969 Modellvorstellungen entwickelt (vergleiche auch MURATA 1969), mit deren Hilfe sie, abweichend von der Q-Hypothese (DUYSENS und SWEERS 1963), in der Lage waren, den langsamen Fluoreszenz-quench neu zu interpretieren. Demzufolge reflektiert die langsame Fluoreszenzabnahme eine Veränderung des Energietransfers zwischen den Pigmentsystemen 1 und 2 (BARBER 1976, WILLIAMS 1977, BUTLER 1978, ARNTZEN 1978). Man hat, da ein Übergang von einem Systemzustand in einen anderen erfolgt, diesen Vorgang als state 1-state 2-Übergang bezeichnet. Berücksichtigt man die Tatsache, daß die beiden Pigmentsysteme unterschiedliche Lichtabsorptionseigenschaften besitzen, dann liegt der Vorteil einer solchen Zustandsänderung darin, daß der Chloroplast auch bei sich ändernden Lichtbedingungen in der Lage ist, eine maximale Photosyntheseaktivität aufrecht zu erhalten. Die gegenwärtigen Erkenntnisse schlagen vor, daß ein state 1-state 2-Übergang mit der Phosphorylierung des lichtsammelnden Chlorophyll a/b-Protein-Komplexes (LHCP) verknüpft ist (ALLEN et al. 1981, BENNETT et al. 1980, HORTON und BLACK 1980, TELFER und BARBER 1981). Die Phosphorylierung erfolgt unter Bedingungen, da die PS 1-Aktivität limitierend beim Elektronentransport zwischen den beiden Pigmentsystemen wirkt und wenn der Plastoquinonpool überreduziert ist (ALLEN et al. 1981, HORTON et al. 1981).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Pflanzenmaterial

Aufgrund der Notwendigkeit einer Anpassung von Pflanzenmaterial und Meßmethode (siehe 1., S. 1) entschieden wir uns für einschichtige Laubmoose. Im wesentlichen bedienten wir uns dabei der allgemein verbreiteten Arten *Mnium hornum* und *Mnium affine*. Beide Moose waren an einem Standort zu finden, der sich vor allem durch eine hohe Bodenfeuchte auszeichnete. *Mnium hornum* war überwiegend entlang der Uferkante eines kleinen Baches, *Mnium affine* hingegen unter einer dichten Krautschicht platziert.

Stichprobenartige Untersuchungen zum Lichtgenuß am Standort ergaben einen Wert von $\sim 1\%$ im Sommer- und $\sim 20\%$ im Winterhalbjahr. Der intensivste Neuzuwachs bei beiden Moosen war zur Zeit hohen Lichtgenusses im zeitigen Frühjahr zu beobachten.

Zwei weitere Gründe hinsichtlich der Wahl des Pflanzenmaterials ergaben sich aus der erwiesenermaßen guten Eignung der Moose zur Bioindikation (siehe 4.4, S. 84) sowie deren problemlosen Kultur im Labor. Letzter Punkt ist, Fragen der Standardisierung betreffend, von besonderer Bedeutung.

3.1.1 Laborkultur

Die Moosentnahme erfolgte im Stoteler Wald, einem nordwestlich Bremens gelegenen, größeren, zusammenhängenden Waldgebiet. Hier sind kleinere Areale eines Erlenbruch-

waldes zu finden, in denen die beiden Moosarten in großer Fülle angesiedelt sind. Von jeder Art wurden Moosrasen ins Labor überführt. Von Laub-, Nadel- und modrigen Holzresten befreit und mehrere Male mit Leitungswasser gespült, wurden die Rasen der beiden Arten in eine handelsübliche Plastikwanne unter durchsichtiger Folie aufbewahrt. Das Gefäß mit den Moosen erhielt einen festen Platz im Labor, so daß sich hieraus im Gefäß folgende mikroklimatische Bedingungen ergaben: Temperatur $19 - 21^{\circ}\text{C}$, Luftfeuchtigkeit $\sim 90\%$, Beleuchtungsstärke maximal 1.500 Lux . Der Hell-Dunkel-Wechsel entsprach dem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus. Die Moosrasen wurden wöchentlich kontrolliert und mit Schimmelpilz befallenes Material entfernt. Nach ca. zwei Monaten hatten sich genügend neue Moosprosse gebildet, daß deren Blätter für Versuche verwendet werden konnten.

3.2 Begasungsanlage

3.2.1 Grundlagen

Die SO_2 -Begasung wurde in einem geschlossenen System entsprechend der "Glockenmethode" von HÄRTEL und MIKLAU (1971) vorgenommen. Das Prinzip der Methode ist es, daß sich in einem luftdichten Raum zwischen einer NaHSO_3 -Lösung und der Umgebungsluft ein von der Konzentration der Lösung und der Temperatur abhängiger SO_2 -Partialdruck einstellt. Befindet sich in der Umgebungsluft reines Wasser, dann löst sich das SO_2 -Gas im Wasser und bildet H_2SO_3 . Man erhält auf diese Weise eine reine H_2SO_3 -Lösung reproduzierbarer Konzentration.

Man kann davon ausgehen, daß das in der Luft befindliche SO_2 nicht als solches in den Pflanzenzellen wirksam wird. Vielmehr wird es sich im Zellsaft zu H_2SO_3 bzw. H_2SO_4 lösen und dergestalt Einfluß nehmen (HÄRTEL und MIKLAU-GRASSL 1974). Wir entschlossen uns deshalb, mit dem Pflanzenmaterial wie in 4.4, S. 84 beschrieben zu verfahren. Dies, zumal eine solche Vorgehensweise weitgehend den natürlichen Bedingungen am Standort entspricht. Dort muß die Moospflanze ihre Wasserversorgung ausschließlich über atmosphärischen Wasserdampf oder Regenfälle decken, in denen letztlich auch das SO_2 -Gas gelöst ist.

3.2.2 Aufbau und Materialien

Das geschlossene Begasungssystem (Abb. 2) bestand aus einem Weithals-Glastopf (Typ Filtrierapparat) mit den Maßen 200 H x 150 mm $\varnothing$ der Firma Glaswerk Wertheim. Zur Begasung wurde der Glastopf mit ca. 2 l NaHSO_3 -Lösung gefüllt, 1,5 l blieben als Luftraum zur Verfügung. Auf einer säurefesten Kunststoffplattform, welche in die Lösung gestellt wurde, konnte eine Petrischale mit Moosblättern plaziert werden.

Mit Hilfe eines Magnetrührers, welcher für eine ständige Bewegung in der Lösung sorgte, war es möglich, eine beschleunigte Gleichgewichtseinstellung zu erreichen. Die entstehenden SO_2 -Konzentrationen im Begasungsraum konnten nach Belieben mit einem Gasspürgerät (Typ D 41) der Firma Drägerwerke kontrolliert werden.

Glastopf und Magnetrührer waren ihrerseits in einem Laborabzug installiert (Abb. 2) und dessen Glaswände mit

Aluminiumfolie zwecks einheitlicher Lichtbedingungen verkleidet. Eine Quecksilberdampflampe (HQL 250 W) der Firma Osram an der Decke des Abzuges sorgte dafür, daß die Moosblätter im Glastopf einer konstanten Beleuchtungsstärke von 900 Lux ausgesetzt waren. Während einer Beleuchtungsphase erhöhte sich die Temperatur im Glastopf von 20° C auf maximal 22° C.

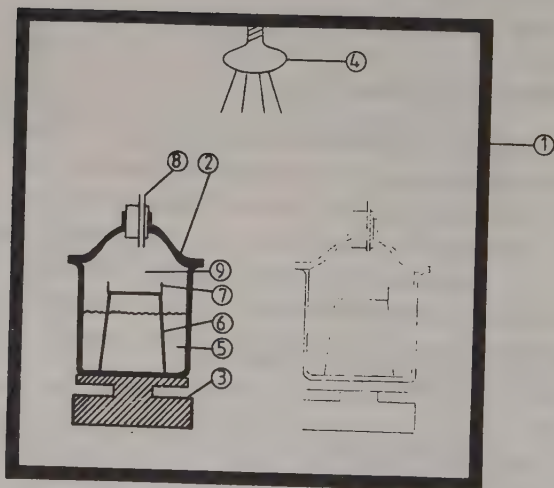


Abb. 2: Die Begasungsanlage

- | | |
|-------------------------------|--------------------------------|
| 1: Laborabzug | 6: Plattform |
| 2: Weithals-Glastopf | 7: Petrischale für Moosblätter |
| 3: Magnetrührer | 8: Zuleitung zur Gas-spürpumpe |
| 4: Quecksilberdampflampe | 9: Gasraum |
| 5: NaHSO ₃ -Lösung | |

3.3 Fluoreszenzmessungen

Der Fluoreszenzmessung lag folgendes meßtechnische Prinzip zugrunde: Das fluoreszenzfähige Objekt wird mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (Farbfilter) und Intensität (Neutralfilter, Leuchtfeldblenden) bestrahlt. Die dabei entstehende Fluoreszenz wird mit Hilfe eines Photomultipliers in eine meßbare Spannung umgesetzt. Das Spannungssignal kann dann auf dem Bildschirm eines Speicheroszillographen sichtbar gemacht werden.

3.3.1 Das Fluoreszenzmikroskop

Zur Untersuchung der zeitlichen Veränderungen der Fluoreszenzintensität stand das Photomikroskop III von Zeiss mit dem Kondensor III RS zur Auflichtfluoreszenz zur Verfügung (HOLZ, PILLER 1977, Fa. ZEISS), siehe Abb. 3. Als Objektiv wurde ein Neofluor von Zeiss mit dem Maßstab 10 und der sehr geringen numerischen Apertur von 0,30 verwendet. Dies hat den Vorteil einer hohen Tiefenschärfe (RUCH und LEHMANN 1973).

Als Lichtquelle diente eine in der Fluoreszenzmikroskopie übliche Metaldampflampe. Im vorliegenden Falle handelte es sich um eine Quecksilberhöchstdrucklampe (Typ HBO 100 W/2) von Osram. Die Stromversorgung erfolgte durch ein werksseitig angepaßtes Gleichrichtervorschaltgerät (Typ VH 100 LKf-2), welches gleichzeitig eine hohe Spannungskonstanz gewährleistete. Die Lampe liefert ein Linienspektrum mit Helligkeitsmaxima bei 440, 550 und 580 Nanometer (Firma Osram). Das Gehäuse, in dem sich die Lampe befindet, ist mit einer Kollektorlinse ausgestattet, so daß es möglich ist, das Lampenlicht optimal in die Präparatebene zu fokussieren. Die Lampe

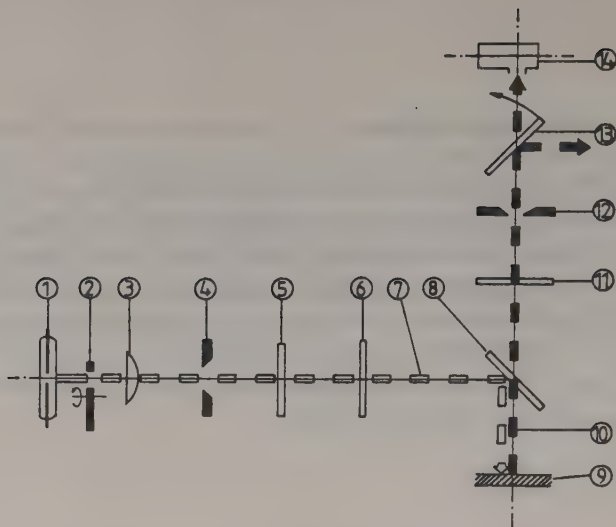


Abb. 3: Lichtweg im Fluoreszenzmikroskop (verändert nach RUCH 1970):

- | | |
|--|---|
| 1: HBO 100 W/2 zur Fluoreszenzanregung | 9: Präparat |
| 2: rotierende Sektorblende | 10: Fluoreszenzlicht |
| 3: Kollektorlinse | 11: Sperrfilter |
| 4: Leuchtfeldblende | 12: Meßfeldblende |
| 5: auswechselbares Graufilter | 13: beweglicher Spiegel zu Lichtwegablenkung in ein Beobachtungsookular bzw. zum Multiplier |
| 6: Erregerfilter | 14: Multiplier |
| 7: anregendes Licht | |
| 8: Farbteiler | |

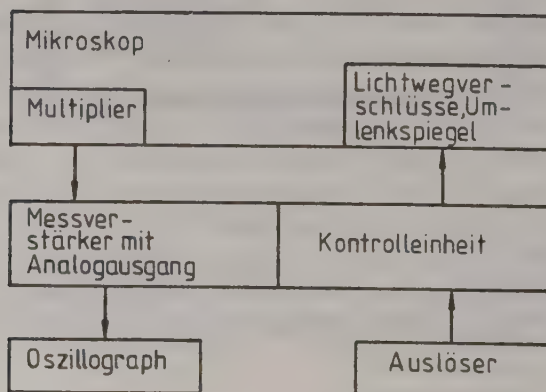


Abb. 4: Blockschaltbild der Meßanlage.

erreicht ihre größte Leuchtdichte nach ca. 30 Minuten Einbrenndauer. Es ist deshalb nicht ratsam, schon vor dieser Zeit mit einer Fluoreszenzanregung zu beginnen. Im selben Lampengehäuse ist darüber hinaus eine rotierende Sektorblende eingebaut, welche das Anregungslicht mit 50 Hz rechteckförmig moduliert. Die Größe des Blendensektors ist so bemessen, daß ein 6,5 ms dauernder Lichtimpuls von einer 13,5 ms dauernden Dunkelphase abgelöst wird. Der gesamte Lichtweg wird von der Blende innerhalb von 250 μ s freigegeben.

Von großer Bedeutung für die Fluoreszenzmikroskopie ist die richtige Kombination der verwendeten Filter. Im vorliegenden Falle wurde eine von Zeiss als fertiger Satz erhältliche Filtergruppe mit den Eigenschaften eines Interferenzbreitbandfilters verwendet (HOLZ). Die Filtergruppe war im Kondensor III RS, an dem auch die Objektive angebracht waren, so eingebaut, daß ein Wechsel leicht erfolgen konnte. Die gesamte Filtergruppe bestand aus:

- a) Einem Erregerfilter mit Bandpaßeigenschaften, dessen maximale Lichtdurchlässigkeit zwischen 390 und 440 nm liegt.
- b) Einem Interferenzfilter oder auch Farbteiler genannt. Mit Hilfe dieses Filters wurde das in einem Winkel von 45° einfallende Anregungslicht bis zu einer Wellenlänge von 620 nm vollständig auf das Präparat reflektiert. Längerwelliges Licht konnte dahingegen das Filter ungehindert passieren.
- c) Einem Sperrfilter (LP 470) mit Langpaßeigenschaften. Dieses Filter ist für alle Wellenlängen kleiner als 470 nm undurchlässig. Stö-

rendes Anregungslicht konnte mit diesem Filter wirkungsvoll beseitigt werden.

Die Umsetzung der Fluoreszenzemission eines bestimmten Objektes in eine meßbare Spannung erfolgte mit Hilfe eines Photomultipliers (Typ R446 UR) der Firma Hamamatsu. Die stabilisierte Versorgungsspannung erhielt der Multiplier von einem Zeiss-Elektronik-Einschubsystem (RUCH und TRAPP 1973).

Neben einer stabilisierenden Hochspannungseinheit enthielt das Einschubsystem auch einen Elektronikatz für eine automatische Steuerung der Schaltfolge von Spiegeln, Verschlüssen und digitaler Anzeigeeinheit (Abb. 4).

An das Elektronik-Einschubsystem konnte auch ein Schreiber oder Oszillograph angeschlossen werden. Dadurch war eine analoge Darstellung des Fluoreszenzsignals möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Speicheroszillographen-System (Typ 5103 N) der Firma Tektronix verwendet.

Ein Meßvorgang gestaltete sich wie folgt (vergleiche Abb. 4):

- Das Präparat wurde möglichst rasch mit einer schwachen Mikroskopleuchte fokussiert.
- Das manuelle Auslösen der Fluoreszenzanregung setzt die Schaltfolgesteuerung in Gang. Der Lichtweg von der Mikroskopleuchte zum Präparat wird gesperrt, jener von der HBO 100-Lampe zum Präparat sowie zum Multiplier dahingegen geöffnet. Die Triggerung des Oszillographen erfolgte im Moment des Auslösens der Fluoreszenzanregung.
- Das aufgezeichnete Fluoreszenzsignal konnte nun entweder photographiert oder auf Pergamentpapier übertragen werden.

Die Eichung der gesamten Meßanordnung wurde mit Hilfe eines aus Uranglas bestehenden Fluoreszenzstandards vorgenommen. Sie erfolgte grundsätzlich nach jeder neuen Inbetriebnahme der Apparatur, und zwar vor dem eigentlichen Meßbeginn.

Eine stufenweise Regulierung der Lichtintensität war durch die Verwendung von Neutralfiltern mit unterschiedlichem Transmissionsgrad möglich. Die Neutralfilter wurden zu diesem Zweck in einer Filtertasche zwischen Lichtquelle und Auflichtkondensor platziert (Abb. 3).

Die jeweiligen Lichtintensitäten wurden mit einer Thermosäule (Modell 212, Power Meter Coherent Radiation) ermittelt. Die Messungen erfolgten auf derselben Fokussierebene wie sie für das Präparat auch gegeben war.

3.4 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse war durch einen systematischen und einen zufälligen Fehler bestimmt. Ersterer war sehr gering und konnte durch das regelmäßige Eichen der Meßapparatur mit Hilfe eines physikalischen Standards (siehe 3.3.1, S.25) schnell erkannt werden. Der zufällige Fehler war von der Variabilität des Pflanzenmaterials abhängig. Da es sich dabei um stochastische Vorgänge handelte, wurden die verschiedenen Versuche nicht wiederholt, sondern, soweit möglich, auf eine hohe Stichprobenzahl, minimal 5 und maximal 30 Moosblätter pro Behandlung, zurückgegriffen.

Aus den Meßergebnissen wurde das arithmetische Mittel $\bar{x}$, die Standardabweichung S_x und der Vertrauensbereich des Mittelwertes $S_{\bar{x}} \cdot t$ (siehe KREEB 1977) berechnet. Der Vertrauensbereich ist gegeben durch:

$$S_{\bar{x}} \cdot t = \pm \frac{S_x}{n - 1} \cdot t, \quad \text{Gl. (1)}$$

wobei $n - 1$ die Zahl der Freiheitsgrade und t den kritischen Wert der "Student's"-t-Verteilung bei 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit (p) wiedergibt (Tabellenwert aus SPIEGEL 1961). Die Überprüfung von Mittelwertsdifferenzen auf Signifikanz erfolgte gemäß

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sigma \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{mit} \quad \text{Gl. (2)}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{n_1 \cdot S_{x1}^2 + n_2 \cdot S_{x2}^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad \text{Gl. (3)}$$

für $n_1 + n_2 - 2$ Freiheitsgraden und $p = 5 \%$. *)

Aufgrund der sehr geringen Meßwertstreuung hat es sich erübrigt, die Standardabweichung in die Kurven einzutragen. In einigen Fällen wurde allerdings der Vertrauensbereich als Balken in die Kurven eingezeichnet. Dadurch ist es möglich, die Signifikanz der zu vergleichenden Mittelwertsdifferenzen abzuschätzen. In solchen Fällen ist in der Abbildungsunterschrift die Zahl der Stichproben unter n angegeben.

Aus Gründen der Anschaulichkeit wurden die Ergebnisse verschiedenartig dargestellt. Grundsätzlich beginnt jede Abbildung mit einer für die jeweiligen Versuchsbedingungen repräsentativen Induktionskurve. Es folgen sodann die aus den Mittelwerten gebildeten Verlaufskurven oder aber Säulendiagramme.

*) Für die Beratung in Fragen zur Statistik bedanke ich mich an dieser Stelle bei den Herren Dr. K. Drescher und W. Schill.

4. VERSUCHE, ERGEBNISSE UND DISKUSSIONEN

4.1 Vorversuche

4.1.1 Die verschiedenen Formen der Induktionskurve

Es wurde beobachtet, daß bei unterschiedlicher Anregungsdauer der Moosblätter die entstehenden Fluoreszenzkurven jeweils unterschiedliche Formen aufweisen. In einem Vorversuch sollte deshalb geklärt werden, welche Abhängigkeit zwischen Anregungsdauer und Kurvenform besteht.

Zur Untersuchung wurden Blätter von *Mnium affine*, *Mnium hornum* und *Mnium undulatum* verwendet. Die Anregungszeiträume bewegten sich im Millisekunden-, Sekunden- und Minuten-Bereich. Die Intensität des anregenden Lichtes war für alle Versuche die gleiche und betrug $1,3 \text{ mW/cm}^2$. Angaben zur Wellenlänge des Lichtes siehe 3.3.1, S. 25.

Die Ergebnisse sind in Abb. 5 a, b, c aufgezeigt. Die dort dargestellten Kurven sind für alle drei Arten gleichermaßen repräsentativ und reproduzierbar. Unterschiede in der Kurvenform der Blätter der einzelnen Arten konnten nicht festgestellt werden, wohl jedoch hinsichtlich der Intensität der Fluoreszenz und zwar sowohl zwischen Blättern einer Art (siehe 4.2.6, S. 76) als auch solchen einer anderen Art. Arttypische Fluoreszenzkurven konnten hier nicht beobachtet werden.

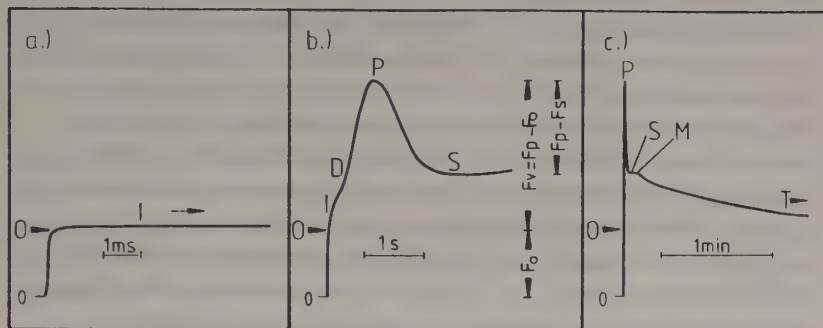


Abb. 5: Die Abhängigkeit der Kurvenform der Fluoreszenzinduktion von der Anregungsdauer.

Die Kurven sind repräsentativ für Blätter von *Mnium affine*, *M. hornum* und *M. undulatum*.

a) sehr schnelle b) schnelle c) langsame Induktion.

O: Niveau der Grundfluoreszenz

I: 1. Anstieg

D: Depression

P: Fluoreszenzmaximum

S: Quasi-steady state-Fluoreszenz

M: 2. Maximum

T: Steady state-Fluoreszenz

Aus der Abbildung ist zu entnehmen, daß sich insbesondere der Kurvenzug einer nur wenige Millisekunden dauernden Anregung erheblich von solchen mit längerer Anregung unterscheidet. Ersteren fehlt die Ausbildung eines Maximums und der daran anschließende steile Abfall, was bei Kurven längerer Anregungsdauer aber geradezu als ein Charakteristikum anzusehen ist.

Eine Identifizierung der einzelnen Kurvenmerkmale erfolgte aufgrund des Vergleiches der Kurve, wie sie in Abb. 5 b zu sehen ist, mit solchen, wie sie beispielsweise von MUNDAY JR. und GOVINDJEE (1969) für *Chlorella*, KATOH et al. (1975) für *Bryopsis* oder LEMOINE und JUPIN (1978) für eine Tabakmutante aufgezeigt und beschrieben wurden. Die Benennung der Kurvenmerkmale erfolgte in Anlehnung an die Terminologie von LAVOREL (1959) sowie MUNDAY JR. und GOVINDJEE (1969) mit den Buchstaben O, I, D, P, S. Es ist nicht zweifelsfrei zu klären, wem die Benennung der weiteren Kurvenmerkmale M und T zuzuschreiben ist.

In dieser Arbeit werden neben den Buchstaben O, P und S die Bezeichnungen F_O , F_P und F_S verwendet. Es soll darunter die Intensität der Fluoreszenz in den Merkmalen O, P und S verstanden sein. Aufgrund des Vergleiches definieren wir den Kurvenzug von Abb. 5 a als eine sehr schnelle Fluoreszenzinduktion mit den Merkmalen Grundfluoreszenz O und einem Teil des 1. Anstieges I. Der Kurvenzug in Abb. 5 b ist eine schnelle Fluoreszenzinduktion und stellt eine vollständige Kautsky-Kurve (FRANCK et al. 1969, PFISTER 1977) dar. In dieser Abbildung sind die Merkmale O, I, D, P, S zu erkennen. Der Kurvenzug von Abb. 5 c schließlich wird als langsame Fluoreszenzinduktion eingeordnet und enthält zusätzlich die Merkmale M und T.

Es sei darauf hingewiesen, daß zur Aufzeichnung einer sehr schnellen und schnellen Fluoreszenzinduktion ein größerer apparativer Aufwand notwendig ist als zur langsamen Fluoreszenzinduktion (siehe auch 4.1.1.1, S. 35).

Die Informationen, die der jeweilige Kurventyp in sich birgt, sind nicht die gleichen. So kann die sehr schnelle

Fluoreszenzinduktion zum einen als ergänzende Messung betrachtet werden, um eine bessere Auflösung der Höhe des Merkmals 0 zu erhalten. Zum anderen erfahren wir aber auch etwas über den 1. Anstieg (zur Bedeutung des 1. Anstieges siehe 2.3, S. 14). Die schnelle Induktion hingegen gibt Aufschluß über das Geschehen während der Einspielvorgänge der Photosyntheseprimärvorgänge. Eine langsame Induktion vermittelt schließlich einen Überblick über die Funktionsfähigkeit der gesamten Photosynthese (PFISTER 1977).

4.1.1.1 Die phänomenologische Beschreibung der Induktionskurven, wie sie bei Moosen der Gattung *Mnium* zu beobachten sind.

Die Blätter der untersuchten drei Moosarten zeigen nach einer vorangegangenen Dunkelphase (siehe 4.2.4, S. 56) bei plötzlichem Einsetzen einer Belichtung konstanter Intensität den aus Abb. 5 a, b, c bekannten zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität. Bei der Beschreibung beschränken wir uns auf Abb. 5 b, da es im wesentlichen das Bild dieses Kurvenzuges sein wird, mit dem sich die folgenden Versuche beschäftigen.

Auf dem Oszillographenschirm bildet sich der Kurvenzug mit dem Merkmal 0 beginnend ab. Der sehr schnelle Anstieg von der Grundlinie bis 0 kann bei der gewählten Elektronenstrahlablenkung nicht aufgezeichnet werden. Wir gehen also davon aus, daß an der Stelle im Kurvenzug, da eine erste Verlangsamung der Fluoreszenzentwicklung zu beobachten ist, die volle Intensität der

Grundfluoreszenz erreicht ist und ein Übergang zum 1. Anstieg erfolgt. Dieser Übergang diene bei allen Messungen als Marke zur Auffindung des Merkmals 0.

Die Festlegung der Position des Merkmals 0 im Kurvenzug ist bei einer schnellen Induktion oftmals mit Schwierigkeiten behaftet. Es muß deshalb eine sinnvolle Aufzeichnungsintensität derart gefunden werden, daß schnelle Teile des Kurvenzuges nicht zu schwach und langsame Teile nicht zu intensiv dargestellt werden. Sollte es doch vorkommen, daß der Übergang von 0 nach I zu undeutlich ist, dann kann eine zusätzliche Anregung zur sehr schnellen Induktion bzw. eine erhöhte Zeitauflösung seitens des Oszillographen von Nutzen sein. Bei Vorhandensein eines Doppelstrahloszillographen mit zweiter Zeitbasis kann auf elegante Weise mit einer Anregung sehr schnelle und schnelle Induktion simultan aufgezeichnet werden.

Der 1. Anstieg ist in ca. 100 ms durchlaufen und mündet in das Merkmal D, welches in den meisten Fällen nicht als eine echte Abnahme der Fluoreszenz zu sehen ist, sondern sich eher als eine kurzfristig verlangsamte Zunahme der Intensität darstellt. Es folgt eine erneute rasche Zunahme der Fluoreszenz bis zu einem Maximum, welches als Merkmal P bezeichnet wird. Die Zeit bis zum Erreichen des Merkmals P ist sehr stark von der Lichtintensität des anregenden Lichtes abhängig (vergleiche 4.2.3, S.48). In Abb. 5 b ist das Maximum nach ca. 800 ms erreicht. Dem Maximum folgt ein steiler Abfall des Kurvenzuges bis zum Merkmal S, welches deutlich über dem Niveau der Grundfluoreszenz liegt; das Merkmal ist nach ca. 1,2 s erreicht. S ist der Ausgangspunkt für

eine, zumindest kurzfristig, konstant verlaufende Fluoreszenz, weshalb in diesem Zusammenhang auch gelegentlich von einem quasi steady state gesprochen werden kann.

4.1.2 Möglichkeiten der Auswertung eines Kurvenzuges vom Typ schnelle Induktion

Bei näherer Betrachtung des Kurvenzuges von Abb. 5 b wird ersichtlich, daß die Fluoreszenzintensität des Kurvenzuges vom Typ schnelle Induktion aus zwei Komponenten besteht. Es sind dies ein intensitätskonstanter und ein intensitätsvariabler Teil. Ersterer wird durch die Intensität der Grundfluoreszenz, letzterer durch diejenige des variablen Teils der Fluoreszenz festgelegt. Wir unterscheiden deshalb künftig zwischen konstanter (F_0) und variabler (F_v) Fluoreszenz (Abb. 5 b, S. 33).

An dieser Stelle erhebt sich die Frage nach den Möglichkeiten der meßtechnischen Weiterverarbeitung des Kurvenzuges. Hier sollen drei verschiedene Möglichkeiten beschrieben werden:

- a) Es bietet sich an, die Fläche unter der Induktionskurve innerhalb festgesetzter zeitlicher Grenzen zu ermitteln ($\int_0^t f(I_{F1}) dt$). Der Flächenwert, d. h. die totale Fluoreszenz kann dann als Maß für Intensitätsänderungen aufgrund veränderter Milieuparameter verwendet werden (siehe ARNDT 1972, 1974). Dieses Maß setzt sich aus den Komponenten konstante und variable Fluoreszenz zusammen. Gegenläufige Veränderungen, wie z. B. eine erhöhte Grundfluoreszenz bei gleichzeitig reduzierter variabler Fluoreszenz, können aus diesem Maß nicht herausgelesen werden.

Die Kenntnis solcher Veränderungen kann aber sehr hilfreich sein beim Versuch einer differenzierten Interpretation der Vorgänge im Chloroplasten.

- b) In einem anderen Verfahren wird die Fläche über der Induktionskurve ermittelt. Die Flächengrenzen sind diesmal das Niveau der konstanten Fluoreszenz und das Maximum der variablen Fluoreszenz. MALKIN und KOK (1966), vergleiche aber auch MURATA et al. (1966), definieren diese Größe als ein Maß der Menge an Elektronenakzeptoren des PS II.
- c) Das meßtechnisch einfachste Verfahren ist es, die Strecke zwischen der Grundlinie, d. h. der Zeitachse, und einem Punkt des Kurvenzuges auszumessen. In unseren Untersuchungen haben wir uns auf die Messung der Strecken $\overline{O_0}$, $\overline{O_P}$ und $\overline{O_S}$ beschränkt. Sie haben den Vorteil, in jedem Kurvenzug einer schnellen Induktion leicht auffindbar zu sein. Die Strecke $\overline{O_0}$ kennzeichnet die Intensität der konstanten Fluoreszenz und wird mit F_0 , $\overline{O_P}$ ist die Intensität der maximalen Fluoreszenz und wird mit F_P bezeichnet (siehe 4.1.1, S. 32). Die variable Fluoreszenz ergibt sich aus der Differenz von:

$$F_v = F_P - F_0 \qquad \text{Gl. (4)}$$

Ergänzend muß erwähnt werden, daß damit nur ein Ausschnitt der eigentlichen "variablen" Fluoreszenz berücksichtigt wird. Tatsächlich ist der gesamte, im Merkmal 0 beginnende, Kurvenzug die variable Fluoreszenz.

Mit F_v wird ein Maß an die Hand gegeben, welches die Veränderungen der photochemischen Abläufe im PS II reflektiert (GOVINDJEE und PAPAGEORGIOU 1971, CLAYTON 1980). Eine Abwandlung der Gleichung (4) gibt BUTLER und KITAJIMA (1975 a), indem er eine "relative" variable Fluoreszenz bildet in der Form F_v/F_o . BUTLER und KITAJIMA (1975 a), KITAJIMA und BUTLER (1975), BUTLER (1978) setzen diese Beziehung mit der Ausbeute der photochemischen Vorgänge an den Reaktionszentren des PS II gleich.

Im gleichen Maße auffallend wie der Anstieg der Fluoreszenz zum Maximum ist deren Abfall zum Merkmal S. In neuerer Zeit wird die Entstehung dieses starken Fluoreszenzquenches u. a. mit der Bildung eines Protonengradienten quer zur Thylakoidmembran in Verbindung gebracht (vergleiche 2.3, S.14). Nach KRAUSE et al. (1983) kann dieser Quench als indirektes Maß zur Intensität der Protonierung des Thylakoidinnenraumes gewertet werden (vergleiche auch BRIANTAIS et al. 1979 sowie JAMAGISHI et al. 1981). Es gilt:

$$\text{Protonengradient} = F_p - F_s \quad \text{Gl. (5)}$$

In der vorliegenden Arbeit wurden, außer es ist gesondert vermerkt, folgende Maße verwendet:

- die Intensität der Grundfluoreszenz F_o ,
- die Differenz der Intensitäten von F_p und F_o als variable Fluoreszenz F_v ,
- die Differenz der Intensitäten von F_p und F_s als indirekter Hinweis für einen Protonengradient bedingte Löschung der Fluoreszenz.

Aus Gründen der Anschaulichkeit und Vergleichbarkeit wurden die absoluten Werte (in mV) der einzelnen Maße in relative Werte umgerechnet; als Bezug dienten die Werte der als Kontrollen ausgewiesenen Proben.

4.2 Die Beeinflußbarkeit der Chloroplastenfluoreszenz durch Randgrößen

4.2.1 Vorbemerkungen

In der Formulierung der Ziele dieser Arbeit war die Frage nach der Eignung der Chloroplastenfluoreszenz zu bioindikativen Zwecken ein zentrales Anliegen.

Was unter Bioindikation verstanden werden kann, ist bereits in der Einleitung definiert worden. Dort ist auch erwähnt, daß die Untersuchungen auf einer physiologisch/biochemischen Ebene stattfinden werden (STEUBING 1975).

Ohne näher auf die Gründe einzugehen, kann behauptet werden, daß Untersuchungen auf einer solchen Ebene im allgemeinen an das Labor gebunden sind. Es ist wichtig, den Modellcharakter solcher Vorhaben hervorzuheben. Eine Übertragung auf Real-, d. h. Freilandbedingungen, kann nur unter Vorbehalten vorgenommen werden (MÜLLER 1981).

Laboruntersuchungen haben zwar gewiß den Vorteil, daß sie unter kontrollierten Bedingungen stattfinden können, Voraussetzung ist aber auch hier die genaue Kenntnis jener Faktoren, welche für das Untersuchungsobjekt wesentlich sind bzw. das Verhalten des Objektes und damit die Meßergebnisse entscheidend prägen können.

Die Chloroplastenfluoreszenz soll unter Laborbedingungen untersucht werden. In 4.2, S. 41ff wird deshalb vorab die Bedeutung einiger Faktoren für die Fluoreszenzinduktion untersucht. Auf die Relevanz dieser Faktoren haben z. T. erst Voruntersuchungen aufmerksam gemacht.

Eine Einteilung der Faktoren gemäß Herkunft unterscheidet diese in endogene und exogene. Zu den Faktoren exogenen Ursprungs sind z. B. Temperatur, Licht und Gasaustausch zu

zählen. In ihrer Extremausbildung sind sie jedoch nicht nur essentielle Größen, sondern haben die Wirkung von Stressoren (KREEB 1971). Erkennen läßt sich dies anhand der pflanzlichen Reaktion, so daß letztlich auch hier von Bioindikation gesprochen werden kann.

Als einen endogenen Faktor kann man z. B. den Entwicklungszustand bezeichnen. Es handelt sich dabei, gerade im Hinblick auf die Bioindikation, um eine sehr wichtige Größe (STEUBING 1975).

Die zur Untersuchung anstehenden Faktoren sind unter dem Begriff Randgrößen subsummiert. Damit soll zum Ausdruck gebracht werden, daß es sich, was das eigentliche Ziel der Untersuchungen - die Schadstoffindikation - anbelangt, nur um begleitende Größen handelt.

Durch die Kenntnis der Wirkung von Randgrößen wird eine wichtige Voraussetzung geschaffen für eine einheitliche Vorgehensweise bei Meßabläufen. Tatsächlich wird erst durch Standardisierungs-Maßnahmen ein reproduzierbares Messen und letztlich auch quantitative Bioindikation möglich.

4.2.2 Dunkelatmungseffekte

Besonders in der Durchlichtmikroskopie ist es allgemein üblich, mit optisch dünnen Präparaten zu arbeiten und diese zwischen Objektträger und Deckglas einzuschließen. Moose mit nur einer Zellschicht, wie sie von uns verwendet wurden, entsprechen diesen Anforderungen vollständig. Andererseits ergeben sich aber gerade hieraus, jedoch nur im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Fluoreszenzinduktion, Probleme. Die Problematik ist dergestalt, daß bei eingeschlossenem Probenmaterial die charakteristischen Induktionsmerkmale vielfach stark verzerrt oder aber überhaupt nicht mehr als solche zu erkennen sind. Ein reproduzierbares Messen ist unter solchen Bedingungen nicht mehr möglich. Es war deshalb von Interesse, welches die Ursachen für diese störenden Effekte sein mochten und was zu ihrer Beseitigung getan werden konnte. Methodisch wurde zu diesem Zwecke wie folgt verfahren: Blätter von *Mnium affine* wurden in einen Tropfen entsalztes Wasser auf einen Objektträger gelegt. Ein Teil der Proben erhielt eine Deckglasabdeckung, ein anderer Teil verblieb ohne Abdeckung. Sämtliche Blätter wurden sodann 30 Minuten dunkelinkubiert und anschließend mit Blaulicht der Intensität $1,3 \text{ mW/cm}^2$ bestrahlt.

4.2.2.1 Ergebnisse

In Abb. 6 a, b, c, d sind Induktionskurven aufgezeigt, wie sie mit und ohne Deckglasabdeckung nach einer Dunkelinkubation entstehen können. Es wird ersichtlich, daß die Behandlungseffekte z. T. so stark ausgeprägt sind, daß sämtliche Induktionsmerkmale davon betroffen sind. Proben

ohne Deckglasbedeckung zeigen eine völlig "normale" Induktionskurve. Wir werden diese Proben künftig als Kontrollen bezeichnen.

Im Falle der schwächsten Effektausbildung (Abb. 6 b) ist lediglich eine Zunahme der Fluoreszenz im Maximum zu beobachten. Der anschließende Fluoreszenzabfall ist geringer und langsamer als bei der Kontrolle. Bei intensiver Effektausbildung (Abb. 6 c, d) ist entweder das Fluoreszenzmaximum stark erhöht und der spontane Fluoreszenzabfall fehlt völlig, oder aber es folgt auf eine erhöhte Grundfluoreszenz eine kurzfristige, aber starke, Depression D.

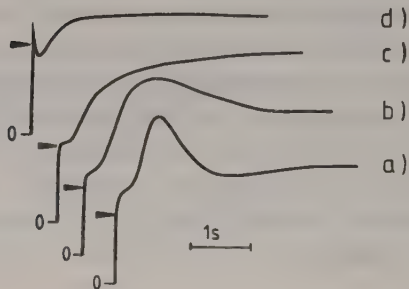


Abb. 6: Die Fluoreszenzinduktion von dunkelinkubierten und abgedeckten Moosblättern.
Dunkelinkubation = 30 Min.; a) ohne, b) - d) mit Deckglas; Objekt: *Mnium affine*.

Die Reversibilität der Effekte ist in Abb. 7 a, b aufgezeigt. In einem Fall wurden Proben, welche ursprünglich mit einem Deckglas abgedeckt waren, erneut 30 Minuten dunkelinkubiert, jedoch ohne Abdeckung. Die darauf folgende Fluoreszenzanregung erbrachte nun wieder eine völlig "normale" Induktionskurve (Abb. 7 a). Im anderen Fall wurden die eingeschlossenen Proben unmittelbar nach einer ersten, 4,5 Sekunden dauernden, Anregung erneut zur Fluoreszenz angeregt. Die sich hieraus ergebende Induktionskurve entspricht nach dieser Behandlung ebenfalls weitgehend jener einer als "normal" klassifizierten Fluoreszenzinduktion (Abb. 7 b).

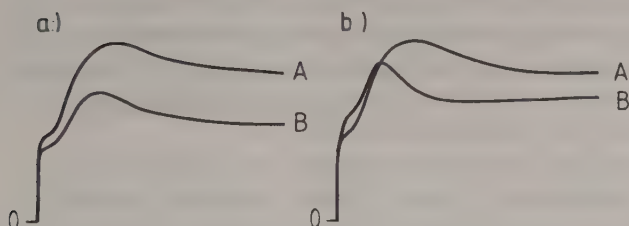


Abb. 7: Die Regeneration der Fluoreszenzinduktion nach einer Dunkelatmung.

- a) A und B jeweils 30 Min. Dunkelinkubation, jedoch A mit und B ohne Deckglas.
 - b) A und B mit Deckglas, jedoch A nur Dunkelphase (30 Min.) und B mit Vorbelichtung (5 sec.);
- Objekt: Mni²⁺ affine.

4.2.2.2 Diskussion

Aus den Ergebnissen ist zu entnehmen, daß zwischen Effektausbildung einerseits und Deckglasabdeckung andererseits ein Zusammenhang besteht. Wiederum scheinen die Beziehungen unwichtig, wenn die eingeschlossenen und dunkeladaptierten Proben eine Vorbelichtung erfahren.

Es muß folglich während der Abdeckung und Dunkelinkubation etwas geschehen sein, was zu einer starken Erhöhung der Fluoreszenz führt und was entweder durch das Abnehmen des Deckglases oder durch Licht rückgängig zu machen ist.

Die Tatsache, daß das Entfernen des Deckglases zu einer Aufhebung der Effekte führt, läßt vermuten, daß es sich um Vorgänge im Zusammenhang mit dem Gasaustausch handelt. Dies ist denkbar, wenn man berücksichtigt, daß aufgrund der einschichtigen Zelllage der Moosblätter das Deckgläschen besonders dicht auf Objektträger und Moosblatt zu liegen kommt. Die Folge ist eine drastisch reduzierte Grenzfläche von Blattoberfläche zur umgebenden Luft.

Die Beobachtung, daß die Effekte auch ohne Entfernung des Deckglases, jedoch nach Vorbelichtung, abgebaut werden, läßt vermuten, daß in den Chloroplasten eine Substanz gebildet wird, welche für die Beseitigung der Effekte sorgt.

Beide Beobachtungen können auf gleiche Ursachen zurückgeführt werden, wenn man annimmt, daß durch die Entfernung des Deckglases dieselbe Substanz in die Chloroplasten diffundieren kann, wie sie während der Belichtung in den Chloroplasten selbst gebildet wird.

Da keine weiteren Experimente zur Klärung der Ursache vorgenommen wurden, kann nur ein Vergleich der Effekte mit Ergebnissen aus der Literatur versucht werden. Dort findet man bei MUNDAY JR. und GOVINDJEE (1969) sowie bei SCHREIBER (1971) und SCHREIBER und VIDAVER (1974) Induktionskurven,

bei denen dieselbe Effektausbildung, wie für die obigen Beispiele aufgeführt, aufgezeichnet sind. Dort wird die Ursache der Effektausbildung mit einem Sauerstoffmangel im Chloroplasten in Verbindung gebracht.

Aufgrund der Versuchsdurchführung ist es gerechtfertigt, unsere Ergebnisse ebenfalls auf einen durch Dunkelatmung bedingten Sauerstoffmangel zurückzuführen.

Die Unterschiedlichkeit der Effektausbildung, wie sie von uns beobachtet wurde, ist ebenfalls interpretierbar: Die Kammern, in denen sich die einzelnen Blätter befanden, waren nicht in jedem Fall gleichermaßen luftdicht abgedeckt. Zum Zeitpunkt der Fluoreszenzanregung lagen deshalb Moosblätter mit unterschiedlichen Stadien des Sauerstoffmangels vor. Sortiert man die Induktionskurven entsprechend der Vorgaben aus der Literatur, wie in Abb. 6 b, c, d getan, zeigt der Vergleich, daß sich Phasen geringen, mittleren und starken Sauerstoffmangels unterscheiden lassen.

4.2.3 Lichtintensität

Form und Intensität der Induktionskurve sind entscheidend von der Intensität des anregenden Lichtes abhängig. Um diese Zusammenhänge zu verdeutlichen, wurden Blätter von *Mnium affine* mit Licht der Intensitäten 0,4; 0,8; 1,0; 1,3 und 390 mW/cm² zur Fluoreszenz angeregt. Zur Meßvorbereitung sind wir wie folgt verfahren: Jeder Intensitätsstufe entsprechend wurden 20 Blätter gleicher Größe und Insertion auf Objektträger in einen Tropfen entsalztes Wasser gelegt. Eine 30 Minuten dauernde Dunkelphase hatte den Zweck, die Moosblätter in einen definierten Ausgangszustand zu versetzen (siehe 4.2.4, S. 56). Nach der Dunkelphase erfolgten die Messungen wie in 3.3, S. 25 beschrieben.

4.2.3.1 Ergebnisse

Aus Abb. 8 ist zu entnehmen, daß bei geringer Intensität des Lichtes auch eine geringe Intensität der Fluoreszenz vorliegt. Es sind keinerlei Anzeichen einer variablen Fluoreszenz zu erkennen. Dies ändert sich, wenn die Intensität des Lichtes erhöht wird: Es hat dann die Grundfluoreszenz weiter zugenommen, darüber hinaus setzt aber auch die Merkmalsausbildung der variablen Fluoreszenz ein. Die Steigerung der Lichtintensität läßt sich zunächst mit dem Erfolg fortsetzen, daß die variable Fluoreszenz immer deutlicher wird. Dann tritt allerdings das Gegenteil ein, indem die prägnante Merkmalsausbildung erneut verloren geht. Dies trifft vor allem für das Merkmal D, aber auch den Abfall von P → S zu, der bei sehr hoher Intensität nur noch langsam und kontinuierlich erfolgt.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß der Anstieg der variablen Fluoreszenz bis zum Maximum mit steigender Lichtintensität immer rascher abläuft. Ein ähnliches Verhalten ist auch bei der Anwendung tiefer Temperaturen zu beobachten (vergleiche 4.2.5, S. 67).

In Abb. 9 ist die relative Intensität der Fluoreszenz in den Merkmalen O, P und die des Abfalles von P $\longrightarrow$ S dargestellt. Die Grundfluoreszenz (F_o) zeigt bis in den Bereich optimaler Merkmalsausbildung (vergleiche Abb. 8) einen zur Lichtintensität proportionalen Zuwachs. Dies läßt sich nachprüfen, indem der Quotient aus der Intensität von F_o und des Lichtes gebildet wird. Der Proportionalitätsfaktor k ist im besagten Bereich weitgehend konstant. Der Wert nimmt jedoch bei einer weiteren Erhöhung der Lichtintensität drastisch ab (siehe Tabelle 1 in Abb. 9), wodurch angedeutet wird, daß F_o einem Sättigungswert entgegenstrebt.

Die variable Fluoreszenz im Merkmal P entwickelt sich erst ab einer bestimmten Lichtintensität aus der Grundfluoreszenz heraus. Sie nimmt dann überproportional zu, um bei einer weiteren Steigerung der Lichtintensität wieder geringer zu werden.

Der Fluoreszenzabfall von P $\longrightarrow$ S ist erst dann erkennbar, wenn auch eine variable Fluoreszenz vorliegt. Nimmt diese zu, dann gilt dasselbe für den Abfall von P $\longrightarrow$ S. Bei sehr hoher Lichtintensität ist ein Merkmal S nicht mehr zu erkennen. Dies führt dazu, daß der Graph von $F_p - F_s$ an dieser Stelle abbricht.

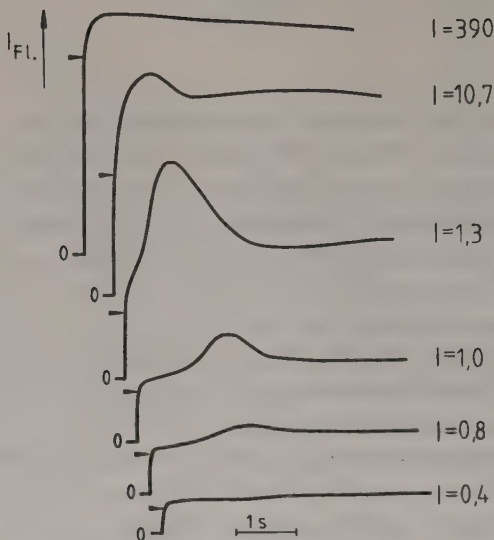


Abb. 8: Die Fluoreszenzinduktion bei unterschiedlichen Lichtintensitäten. I = Lichtintensität (mW/cm^2); Objekt: Mniium affine.

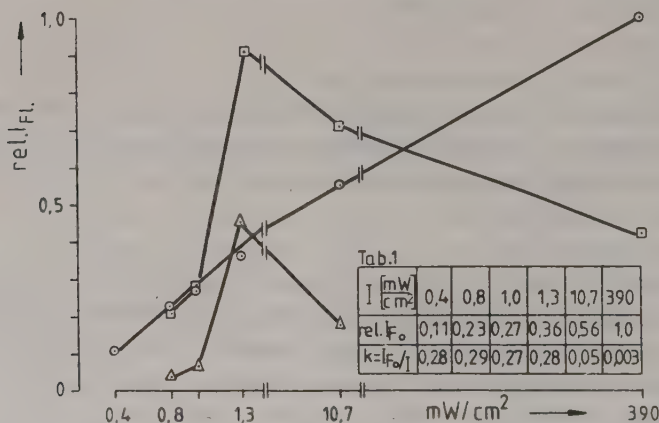


Abb. 9: Die relative Intensität der Fluoreszenz (rel. $I_{F1.}$) bei unterschiedlichen Lichtintensitäten.

○ rel. $I_{F1.}$ von F_0 , Bezug: I_{F_0} bei $390 \text{ mW}/\text{cm}^2$;
 □ rel. $I_{F1.}$ von F_v im Merkmal P, Bezug: I_{F_v} bei $390 \text{ mW}/\text{cm}^2$; △ rel. Intensität des Abfalls von P → S, Bezug: Abfallsintensität bei $10,7 \text{ mW}/\text{cm}^2$.

Tab. 1: Die proportionale Zunahme von I_{F_0} bei wachsender Lichtintensität.

4.2.3.2 Diskussion

Die Versuche zur Abhängigkeit der Fluoreszenzinduktion von der Lichtintensität erlauben die Unterscheidung dreier Fluoreszenzentwicklungsphasen

- eine Phase I, wie sie bei geringen Lichtintensitäten vorliegt,
- eine Phase II bei mittleren Intensitäten mit Sättigungswirkung,
- eine Phase III bei exzessiven Intensitäten mit Schädigungswirkung.

Phase I: Hier entsteht lediglich eine zeitlich konstante Fluoreszenz, auch als Grundfluoreszenz bekannt. Zwischen der Intensität des eingestrahnten Lichtes und F_0 besteht eine lineare Beziehung. Eine Erklärung hierfür läßt sich aus folgenden Überlegungen ableiten: Es ist bekannt, daß die Fluoreszenz den Chlorophyll a-Molekülen des LHCP- und PS 2-Komplexes entstammt (vergleiche 2.3, S. 14). Die Fluoreszenzemission entsteht dort, wenn es den Excitonen innerhalb ihrer Lebensdauer nicht gelingt, in einem photochemischen Prozeß am RZ 2 in chemisch speicherbare Energie umgewandelt zu werden. Es ist einleuchtend, daß mit steigender Lichtintensität die Konzentration der sich im angeregten Zustand befindenden Chlorophyll a-Moleküle zunimmt. Dies geschieht in linearer Abhängigkeit zur Lichtintensität. Erhöht sich die Zahl angeregter Chlorophyll a-Moleküle einerseits, dann nimmt andererseits, und zwar gleichfalls linear, die Wahrscheinlichkeit eines Energieabbaues, bei dem eine Fluoreszenzemission entsteht, zu (DANCKWORTT und EISENBRAND 1964, HOFFMANN 1967, RABINOWITCH und GOVINDJEE 1969).

Diese Linearität der Beziehung hat zumindest solange Gültigkeit, als die Konzentration der im Grundzustand befindlichen Chlorophyllmoleküle größer ist als diejenige der angeregten Moleküle (HOFFMANN 1967).

Das Fehlen einer variablen Fluoreszenz in Phase I ist darauf zurückzuführen, daß der Anteil photochemisch verarbeiteter Energie zu gering ist, um einen Elektronenstau zwischen den beiden Reaktionszentren hervorzurufen. Solange es jedoch zu keiner Anhäufung reduzierter Komponenten der Elektronentransportkette kommt, kann es auch keinen Energiestau, und folglich zeitlich beschränkte Zunahme der Fluoreszenz in den LHCP- und PS 2-Komplexen geben.

In Phase I ist des weiteren auch keine Löschung der Fluoreszenz zu beobachten. Es muß deshalb davon ausgegangen werden, daß fluoreszenzlöschende Vorgänge, wie beispielsweise die Bildung eines Protonengradienten, nur schwach ausgeprägt oder gar nicht vorhanden sind (BARBER 1976).

Aus der Gesamtheit der Überlegungen ist schließlich abzuleiten, daß eine Fluoreszenzkurve, wie sie in Phase I vorliegt, Ausdruck eines, bezüglich des Parameters Licht, nicht gesättigten Photosyntheseapparates sein kann.

Phase II: In dieser Phase kommt zur zeitlich konstanten Fluoreszenz eine zeitlich variable Fluoreszenz hinzu. Diese ist durch Eigenschaften gekennzeichnet, welche der Grundfluoreszenz fehlen: So gibt es in der variablen Fluoreszenz Abschnitte, in denen die Intensität der Fluoreszenz langsamer und solche, in denen sie schneller zu- bzw. abnimmt. Dies deutet darauf hin, daß die Elektronentransportkette

zwischen dem PS 2 und PS 1 zeitweise nicht in der Lage ist, die absorbierte Lichtenergie vollständig zu verarbeiten. Es entsteht ein Elektronenstau in Richtung RZ 2, so daß dieses in seiner photochemischen Aktivität behindert wird. Die energiereichen Zustände der Chlorophyll a-Moleküle im LHCP- und PS 2-Komplex müssen nun in erhöhtem Maße als Fluoreszenz abgebaut werden (BUTLER 1978).

Die Geschwindigkeit, mit der die Fluoreszenz zum Maximum ansteigt, ist von der Lichtintensität abhängig (MALKIN und KOK 1966, KOBAYASHI et al. 1975). Dies dürfte wohl darauf zurückzuführen sein, daß die Menge der Reaktionszentren, welche einen bestimmten PQ-Pool als sekundären e^- -Akzeptor benutzt, mit zunehmender Intensität des anregenden Lichtes größer wird. Der entsprechende PQ-Pool wird folglich immer schneller in den reduzierten, und damit inaktiven, Zustand überführt. Es sei darauf hingewiesen, daß diese Interpretation dieselbe Grundannahme zur Voraussetzung hat, wie sie in 4.2.5, S. 67 im Zusammenhang mit der Erklärung der temperaturbedingten Verzögerung des Fluoreszenzanstieges erwähnt werden wird.

Die starke Fluoreszenzlöschung im Abfall von $P \rightarrow S$ deutet darauf hin, daß neben der Beseitigung der Engpässe in der Elektronentransportkette auch ein Protonengradient quer zur Thylakoidmembran aufgebaut wurde. Die Löschung ist zum größten Teil auf einen thermalen Energieabbau am RZ 2 zurückzuführen (BRIANTAIS et al. 1979, KRAUSE et al. 1983). Andererseits konnten BRADBURY und BAKER (1981) während des $P \rightarrow S$ -Abfalles auch eine Zunahme des Energietransfers zugunsten des PS 1 feststellen.

Tatsächlich ist eine solche Neuverteilung der Energie plau-

sibel, da die Moosblätter mit PS 2-Licht (siehe 2.2, S.7) aus dem dunkeladaptierten Zustand (state 1) angeregt wurden. Dies ist aber ein Systemzustand, für den eine hohe Fluoreszenz geradezu charakteristisch ist (BARBER 1976).

Anders als für Phase I, kann hier die Annahme vertreten werden, daß eine Fluoreszenzkurve, wie sie in Phase II vorliegt, als Ausdruck eines lichtgesättigten Photosyntheseapparates verstanden werden muß.

Phase III: In Phase III kann keine wesentliche Zunahme der Gesamtfluoreszenz beobachtet werden; auffallend ist der hohe Anteil der Grundfluoreszenz. Die variable Fluoreszenz wird dadurch stark reduziert, und die charakteristischen Induktionsmerkmale sind nicht mehr zu erkennen. Offensichtlich sind in dieser Phase Regulierungsvorgänge nicht mehr möglich, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Komponenten des Elektronentransportes permanent überreduziert sind. Dies entspricht übrigens durchaus der Wirkung von Na-Dithionit, welches eine vollständige Reduktion des PQ-Pools hervorrufen kann (VELTHUYS und AMESZ 1973, JENNINGS und FORTI 1975, VERNOTTE et al. 1979).

Die hohe Grundfluoreszenz spricht dafür, daß die Reaktionszentren des PS 2 ebenfalls geschlossen sind und die überschüssige Lichtenergie in den LHCP- und PS 2-Komplexen als Fluoreszenz abgebaut wird.

Der in Phase II gut strukturierte P $\longrightarrow$ S-Abfall, es läßt sich dort ein Merkmal S definieren, wird in Phase III vermißt. Statt dessen ist nur eine langsame und stetige Abnahme der Fluoreszenz zu beobachten. Da die starke Löschung der Fluoreszenz fehlt, ist anzunehmen, daß weder eine Neuverteilung der Energie zugunsten des PS 1 stattfindet noch

ein Protonengradient aufgebaut wird.

Die Ursache für das langsame und stetige Nachlassen der Fluoreszenz nach P ist wahrscheinlich auf ein lichtbedingtes Ausbleichen der Chlorophyll a-Moleküle zurückzuführen. Es konnte nämlich beobachtet werden (hier nicht weiter aufgeführt), daß bei einer Anregung mit sehr hohen Intensitäten im Verlauf weniger Sekunden die Fluoreszenz von Intensivrot in Schwachrot überging. Durch das Aufweiten der Leuchtfeldblende (siehe Abb. 3) konnte zusätzlich sichtbar gemacht werden, daß die ursprünglich beleuchtete Fläche mit ihrer schwachroten Fluoreszenz sich von einer sie umgebenden größeren Fläche mit intensivroter Fluoreszenz abhob.

Eine Induktionskurve, wie sie sich in Phase III darstellt, kann folglich aufgrund der angeführten Punkte als Hinweis dafür gewertet werden, daß der Photosyntheseapparat exzessiven und damit schädigenden Lichtintensitäten ausgesetzt ist.

4.2.4 Dunkelphasen

Moosblätter, welche bereits einmal zur Fluoreszenz angeregt worden waren, zeigen erst nach einer Dunkelphase von ausreichender Dauer eine erneute vollständige Induktion (LAVOREL 1959, MUNDAY JR. und GOVINDJEE 1969). Zu kurze Dunkelphasen ergeben immer nur Induktionskurven, welche in der Intensität als auch der Kurvenform zwischen konstanter und maximaler variabler Fluoreszenz liegen (MALKIN und KOK 1966).

Der Übergang des Photosyntheseapparates aus dem lichtadaptierten in den dunkeladaptierten Zustand ist eine Funktion der Zeit. Gelegentlich werden in der Literatur Dunkelzeiten genannt mit Werten im Bereich zwischen 4 und 20 Minuten (MALKIN und KOK 1966, MUNDAY JR. und GOVINDJEE 1969 a, b, KOBAYASHI et al. 1975).

Voruntersuchungen haben gezeigt, daß Anregungsdauer einerseits und Zeitbedarf bis zur Rückkehr in den dunkeladaptierten Zustand andererseits eng miteinander verknüpft sind. Im folgenden Experiment sind wir der Frage nachgegangen: Wie lang muß eine Dunkelphase sein, bis die Chloroplasten aus einem lichtadaptierten in einen dunkeladaptierten Zustand überführt worden sind?

4.2.4.1 Meßprogramm zur Ermittlung der Dunkelphasendauer

Als Meßobjekte dienten Blätter von *Mnium affine*, die alle dem Mittenbereich der Moosstaude entstammten. Jeweils fünf Parallelen wurden folgendem Meßprogramm (siehe Abb. 10) unterzogen:

- 1.) Nach einer Dunkelphase von mindestens 30 Minuten Dauer erfolgte eine 5 Minuten dauernde Anregung zur Fluoreszenz.
- 2.) Die nach 1.) behandelten Proben wurden sodann Dunkelphasen in der Reihenfolge 5, 10, 20, 30 Minuten unterzogen. Die jeweils vorangegangenen, 5 Minuten dauernden, Anregungen zur Fluoreszenz gelten als Vorbelichtung mit der Wirkung, das System in den lichtadaptierten Zustand zu überführen. Zur Anregung bzw. Vorbelichtung diente ein breitbandiges Blaulicht mit einer Intensität von $1,3 \text{ mW/cm}^2$.



Abb. 10: Meßprogramm zur Ermittlung der Dunkelphasendauer.
Zahlen: Zeit in Minuten, Pfeile: $\uparrow \downarrow$ anregendes Licht ein/aus.

4.2.4.2 Ergebnisse

Abb. 11 zeigt Induktionskurven von Moosblättern, welche unterschiedlichen Dunkelphasen mit und ohne Vorbelichtung unterzogen wurden. Eine 30 Minuten dunkelinkubierte Probe ohne Vorbelichtung emittiert eine ausgeprägte variable Fluoreszenz mit einem intensiven Peak P und einem steilen Abfall $P \rightarrow S$. Nach 5 Minuten Anregung (nicht dargestellt) war keine weitere Abnahme der Fluoreszenzintensität mehr erkennbar. Dies wurde als Hinweis für einen lichtadaptierten Zustand gewertet.

Das Bild der Induktionskurve ist jedoch erheblich verändert, wenn auf eine erste Anregung nach kurzer Dunkelphase eine zweite Anregung folgt. In dem Fall ist vor allem die Intensität des Peaks P stark reduziert. Erst nach längeren Dunkelphasen beginnt sich der Wert von F_P erneut dem einer Probe ohne Vorbelichtung bzw. dunkeladaptierten Zustandes zu nähern.

In Abb. 12 sind die relativen Werte von F_0 , F_v im Merkmal P und der Abfall von $P \rightarrow S$ in Abhängigkeit der Dunkelphasendauer dargestellt. Als Bezug dienten die Intensitätswerte der Induktionskurven von Proben ohne Vorbelichtung (Kontrolle). Wir können daraus noch einmal entnehmen: je kürzer die Dunkelphasendauer, in unserem Fall mindestens 5 Minuten, desto intensiver fallen die Veränderungen der Induktionskurve aus. Die variable Fluoreszenz bei P erfährt eine Intensitätsabnahme von nahezu 50 % ihres Ausgangswertes, F_0 hingegen zeigt nur eine schwache (ca. 10 %) Intensitätsabnahme. Die Werte beider Maße nähern sich mit zunehmender Dunkelinkubation erneut denen der dunkeladaptierten Proben und haben diese nach einem t_D von 30 Minuten zu mehr als 90 % erreicht.

Dunkelphasenabhängig ist auch die Intensität des Fluoreszenzabfalles von $P \rightarrow S$. Diese charakteristische Fluoreszenzlöschung beträgt bei vollständig dunkeladaptierten Proben 26 %. Bei Proben mit Vorbelichtung und kurzer Dunkelinkubation, d. h. in einem Stadium zwischen licht- und dunkeladaptiert befindlich, können wir einen zusätzlichen Quench von ca. 10 % beobachten. Der Gesamtquench von $P \rightarrow S$ in bezug auf F_p einer dunkeladaptierten Probe beträgt dann 36 % (vergleiche Abb. 12). Mit zunehmender Dunkelphasendauer wird die zusätzliche Quenchintensität wieder geringer und erreicht nach einem t_D von 30 Minuten erneut den Wert dunkeladaptierter Proben.

Nach jedem Versuchsdurchgang erfolgte eine mikroskopische Beobachtung der Moosblattzellen mit dem Ziel, lichtbedingte Lageveränderungen der Chloroplasten in den Zellen erkennen und damit verbundene mögliche Einflüsse auf die Fluoreszenzintensität mitberücksichtigen zu können. Die Beobachtungen erbrachten jedoch keinerlei Anzeichen einer visuell erkennbaren Veränderung der Chloroplastenanordnung in den Zellen.

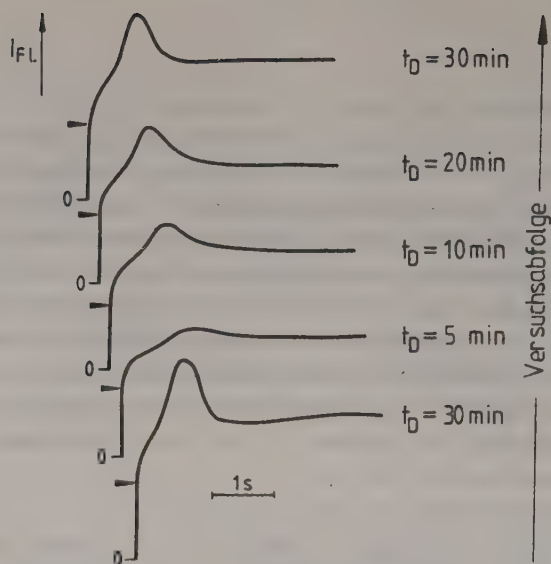


Abb. 11: Die Fluoreszenzinduktion in Abhängigkeit der Dunkelphasendauer. Objekt: Mniium affine.

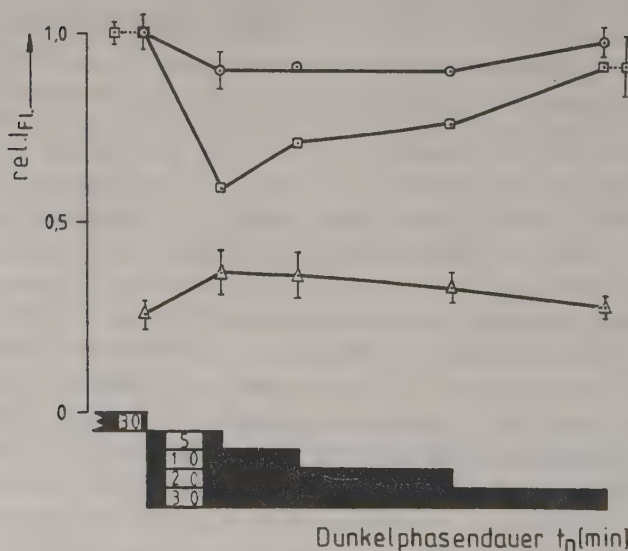


Abb. 12: Die relative Intensität der Fluoreszenz (rel. I_{F1}) in Abhängigkeit der Dauer einer Dunkelinkubation. t_D = Dauer der Dunkelphase in Min.; $\circ$ rel. I_{F1} von F_0 , Bezug: I_{F0} bei $t_D = 30$ Min. zu Versuchsbeginn; $\square$ rel. I_{F1} von F_V , Bezug: I_{FV} bei $t_D = 30$ Min. zu Versuchsbeginn; $\triangle$ rel. Intensität des Abfalls von P $\rightarrow$ S, Bezug: I_{FP} bei $t_D = 30$ Min. zu Versuchsbeginn; Objekt: Mniium affine, $n = 5$.

4.2.4.3 Diskussion

Die Versuche verdeutlichen den Unterschied der Fluoreszenzinduktion von dunkeladaptierten und lichtadaptierten Moosblättern. Der Übergang von einem Zustand in den anderen ist reversibel, wobei für die jeweilige Übergangsrichtung unterschiedlicher Zeitbedarf zu beobachten ist. Ein Wechsel von dunkel- zu lichtadaptiert erfordert ca. 5 Minuten, für den umgekehrten Weg sind etwa 30 Minuten erforderlich. Die stärksten Veränderungen während der Zustandsübergänge sind für die variable Fluoreszenz im Merkmal P zu beobachten. F_0 zeigt während der Zustandsübergänge nur geringe, aber doch erkennbare, Veränderungen von 10 %, was in gleicher Weise für den Fluoreszenzquench von $P \rightarrow S$ gilt. Der lichtadaptierte Zustand unterscheidet sich also vom dunkeladaptierten durch eine insgesamt reduzierte Fluoreszenz.

Hier stellt sich die Frage nach den Ursachen der in allen Merkmalen reduzierten Induktionskurven lichtadaptierter Proben. Folgende Erklärungsmöglichkeiten lassen sich in Betracht ziehen:

- 1.) Die zur Anregung verwendete Lichtintensität war zu hoch und die damit einhergehende Schädigung der Pigmente verursachte eine Abnahme der Fluoreszenzintensität insgesamt. Aufgrund der Reversibilität der Effekte nach ausreichender Dunkelphasendauer ist dieser Punkt als Erklärungsmöglichkeit jedoch auszuschließen.
- 2.) Phototaktische Orientierungsbewegungen der Chloroplasten (SEITZ 1970) verändern die Größe der lichtabsorbierenden Oberfläche. Dieser Vorgang kann durchaus als Ursache für eine veränderte Fluoreszenzintensität angesehen werden, derart, daß bei geringer Oberfläche eine vergleichsweise schwächere Fluoreszenzintensität zu erwarten ist als bei großer Oberfläche.

Bisher bekannte experimentelle Befunde belegen, daß, insbesondere nach Belichtungen von längerer Dauer, mikroskopisch sichtbare Lageveränderungen der Chloroplasten in der Zelle stattfinden können. Die Art der Lageveränderungen (Starklicht-/Schwachlichtstellung) ist abhängig von der Intensität der Beleuchtung (SEITZ 1970). Neuere Ergebnisse zeigen, daß auch kurze Lichtimpulse eine mikroskopisch nicht sichtbare Translokation der Chloroplasten herbeiführen können (GABRYŚ et al. 1981). Die Wirkung eines Lichtimpulses wird frühestens nach 15 - 30 Minuten meßbar (GABRYŚ et al. 1981).

Bei Betrachtung unserer Ergebnisse stellen wir fest:

- a) Es haben keine mikroskopisch sichtbaren Lageveränderungen stattgefunden, ob mikroskopisch nicht erkennbare eingetreten sind, ist unbekannt.
 - b) Eine Abnahme der Fluoreszenz in allen Kurven teilen ist im vorliegenden Versuch, 5 Minuten nach einer Beleuchtung bzw. Fluoreszenzanregung, bereits intensiv ausgebildet. Mit zunehmendem zeitlichen Abstand (t_D) zwischen zwei Anregungen nimmt diese jedoch insgesamt wieder zu. Wir folgern hieraus, daß eine Lageveränderung als Ursache für die Fluoreszenzminderung auszuscheiden ist.
- 3.) Physiologische Abläufe und mikrostrukturelle Veränderungen im Chloroplasten sind Ursache einer starken Minderung der Fluoreszenz. Es läßt sich ein wesentlicher Teil der im lichtadaptierten Zustand reduzierten

Fluoreszenzinduktion auf Vorgänge zurückführen, bei denen:

- a) eine verstärkte Reoxidation der Komponenten des Elektronentransportes vermehrt Elektronenlücken zum PS 2 schafft (IKEGAMI und KATOH 1972, VERNOTTE et al. 1979, siehe auch 2.3, S. 14.
- b) ein Kationenefflux aus dem Thylakoidinnenraum die Membranstruktur beeinflusst und als eine Ursache für einen veränderten Energietransfer zwischen den Pigmentsystemen PS 1 und PS 2 anzusehen ist (BARBER 1976, 1980, WILLIAMS 1977, BUTLER 1978),
- c) ein im Zusammenhang mit b) entstehender Protonengradient quer zur Thylakoidmembran nach KRAUSE et al. (1983) den Energieabbau via thermischen Wege erhöht (vergleiche auch BRIANTAIS et al. 1979 sowie 2.3, S. 14.

Es wurden Punkte genannt, die erklären helfen, welche Fluoreszenzsteuerprozesse bereits frühzeitig nach Einsetzen einer Beleuchtung wirksam werden. Sie lassen jedoch offen, welchen Vorgängen der im Verlauf längerer Belichtung zusätzlich hinzukommende Fluoreszenzquench zuzuordnen ist. Den Schlüssel zu einer Klärung ergibt eine erneute Betrachtung des Meßprogrammes (Abb. 10, S.57) unter Einbeziehung einiger Vorbemerkungen.

Entsprechend den Vorstellungen zum Aufbau der Pigmentsysteme bestehen PS 1 und PS 2 aus unterschiedlichen Pigment-Protein-Komplexen (HILLER und GOODCHILD 1981) mit voneinander abweichenden Absorptionseigenschaften. Es ist daher möglich,

die beiden Pigmentsysteme selektiv mit Licht, welches vorzugsweise vom PS 1 (Licht 1, $\lambda = 690 - 720 \text{ nm}$) oder aber mit Licht, welches vom PS 2 (Licht 2, $\lambda \leq 645 \text{ nm}$) absorbiert wird, anzuregen (BENNET 1983). Da das PS 1 im längerwelligen Bereich des Spektrums absorbiert als das PS 2, kann Licht 2 auf beide Photosysteme verteilt werden. Aus energetischen Gründen ist ein Transfer von Licht 1 auf das PS 2 jedoch nicht möglich (WILLIAMS 1977). Im Falle einer ausschließlichen Licht 2-Einstrahlung ist der Photosyntheseapparat in der Lage, die ungleichgewichtige Energieverteilung zwischen den beiden Pigmentsystemen zu beheben, indem er eine Neuverteilung der Energie zugunsten des PS 1 vornimmt; das ist aber ein state 1-state 2-Übergang (siehe 2, S. 6).

Einen Zusammenhang zwischen obigen Überlegungen und dem Meßprogramm bzw. den Versuchsergebnissen ist nun derart zu sehen:

Im Versuch wurde durch eine lange Dunkelpase, mit dem Ziel einen dunkeladaptierten Zustand des Systems herbeizuführen, dasselbe erreicht, als hätte man mit Licht 1 bestrahlt, nämlich einen Übergang in den state 1 (BARBER 1976, WILLIAMS 1977, BARBER et al. 1981). Blaulichtgaben, mit denen eine Fluoreszenzinduktion herbeigeführt wurde, entsprechen in ihrer Wirkung der des Licht 2. Die Proben wurden dadurch in den lichtadaptierten Zustand, der dem state 2 entspricht, überführt.

Während der mit Blaulicht alternierenden Dunkelpasen war die Möglichkeit einer Rückkehr des Systems in den state 1 gegeben. Dies gelingt während kurzer Dunkelpasen jedoch nur teilweise und ist wahrscheinlich mit Vorgängen, wie z. B. dem Abbau des pH-Gradienten und Umkehr des Kationen-

fluxes in den Thylakoidinnenraum, in Verbindung zu bringen. Erkennbar wird das vor allem durch die rasche Zunahme der Fluoreszenzintensität im Merkmal P (Abb. 12), während gleichzeitig die Fluoreszenz in S, aber ganz besonders in O, über längere Zeit von einer Dunkelinkubation unbeeinflusst bleibt. Erst nach langer Dunkelphase kommt eine Umkehr der Vorgänge, welche für einen langsamen Quench verantwortlich sind, hinzu (Abb. 12).

Folgende Punkte sind herauszustellen:

- a) Während einer Blaulichtbestrahlung (Licht 2) erfolgte neben einer raschen auch eine langsame Löschung der Fluoreszenz.
- b) Durch Dunkelinkubation (Wirkung entsprechend Licht 1) ist die Löschung während einer schnellen und einer langsamen Phase umkehrbar.

Unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Meßmethodik können die Ergebnisse, langsame Fluoreszenzlöschung und deren Regeneration, als Indiz für Vorgänge gewertet werden, die im Zusammenhang mit $S_1 - S_2$ -Übergängen stehen. Gemeint ist die über den Redoxzustand des Plastoquinons (ALLEN et al. 1981, HORTON et al. 1981, vergleiche auch MARKWELL et al. 1982) induzierte Phosphorylierung/Dephosphorylierung der LHCP-Komplexe. Eine LHCP-Phosphorylierung wird heute aber als die Ursache von elektronenmikroskopisch sichtbaren Neuorientierungen der LHCP-, PS 1- und PS 2-Komplexe in der Thylakoidmembran angesehen (STAEHELIN et al. 1982, BARBER 1983, KYLE et al. 1983). Die Veränderungen mikrostruktureller und mikroorganisationeller Art eröffnen dem System die oben erwähnte Möglichkeit einer Neuver-

teilung der eingestrahnten Lichtenergie (BARBER 1982, HAWORTH et al. 1982, KYLE et al. 1983, TELFER et al. 1983) und damit eine Anpassung an unterschiedliche Lichtqualitäten und Intensitäten.

Der Zeitbedarf für den Vorgang der LHCP-Phosphorylierung und Dephosphorylierung wird von HORTON und BLACK (1981) mit $t_{1/2}$ von ca. 3 Minuten für ersteren Vorgang und $t_{1/2}$ von ca. 5 - 10 Minuten für letzteren Vorgang angegeben. Letzter Wert entspricht in guter Näherung dem von uns ermittelten Zeitbedarf für einen Übergang vom lichtadaptierten in den dunkeladaptierten Zustand (state 2 $\triangleq$ phosphoryliert $\rightarrow$ state 1 $\triangleq$ dephosphoryliert). Der Zeitbedarf für einen Übergang vom dunkel- in den lichtadaptierten Zustand wurde nicht experimentell ermittelt, sondern, auf früheren Beobachtungen zur steady state-Fluoreszenz fußend, mehr oder weniger willkürlich vorgegeben. Mit 5 Minuten Bestrahlungsdauer entspricht aber auch dieser Wert demjenigen, wie er im Zusammenhang mit der Phosphorylierung genannt wird.

Aus dem Gesagten schließen wir, daß die ausgeprägte Fluoreszenzinduktion, wie sie in Abb. 11 ($t_D = 30$ Min.) zu sehen ist, den Zustand des Systems wiedergibt, wie er für einen state 1 charakteristisch ist. Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität insgesamt (Abb. 11; $t_D = 5$ Min.) ist ein Hinweis, daß ein state 2 vorliegt. Schließlich erachten wir die Ergebnisse als indirekten Nachweis dafür, daß auch in Chloroplasten von Moosblättern ein state 1-state 2-Übergang stattfinden kann.

4.2.5 Temperatur

Die Chlorophyllfluoreszenz wurde schon von KAUTSKY (1934) als sehr temperaturabhängig bezeichnet. Diese Abhängigkeit ist besonders deutlich bei Chlorophyll in intakten Chloroplasten (ARENZ 1970).

Im folgenden Versuch sind wir der Frage nachgegangen, welchen Einfluß unterschiedliche Temperaturen auf die Fluoreszenzintensität und deren zeitlichen Verlauf bei Moosblättern nehmen können.

4.2.5.1 Methodik

Als Pflanzenmaterial dienten Blätter von *Mnium affine* aus Laborkulturen (siehe 3.1.1, S. 21). Die Untersuchungen wurden für die Temperaturstufen 4°, 19°, 30° und 40°C vorgenommen. Die Dauer der Exposition der Proben bei den einzelnen Temperaturstufen betrug 5 Minuten. Die Temperaturapplikation vorbereitend, wurden die Moosblätter einzeln und ohne Deckglasbedeckung (vergleiche 4.2.2, S. 43) auf einen Objektträger in einen Tropfen entsalztes Wasser gelegt. Eine anschließende Dunkelinkubation, im Verlauf derer auch die Temperaturexposition erfolgte, hatte den Zweck, die Proben in einen dunkeladaptierten Zustand zu überführen (siehe 4.2.4, S. 56). Von diesem Zustand ausgehend, erfolgte die Anregung zur Fluoreszenz und deren Messung. Für jede Temperaturstufe wurden 20 Parallelen durchgemessen.

Die Kältewirkung ließ sich dadurch erreichen, daß die mit Moosblättern belegten Objektträger auf schmelzende Eisstücke in einer Plastikbox aufgelegt wurden.

Die Wärmewirkung wurde durch Auflegen der Objektträger auf eine Heizplatte, welche auf die gewünschte Temperatur vorgeheizt war, erreicht.

4.2.5.2 Ergebnisse

Der Einfluß der Temperatur auf die Fluoreszenz läßt sich deutlich anhand der veränderten Phänomenologie der Induktionskurven belegen (Abb. 13). Wir stellen fest, daß bei tiefen Temperaturen insgesamt eine Zunahme, bei hohen Temperaturen eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen ist. Der ansonsten bei Raumtemperatur deutlich erkennbare Abfall der Fluoreszenz von $P \rightarrow S$ ist bei tiefer Temperatur stark eingeschränkt und bei hoher Temperatur nicht mehr erkennbar. Bemerkenswert ist der bei tiefer Temperatur zu beobachtende erhöhte Zeitbedarf bis zur Entstehung des Merkmals P. Der Anstieg ist gerade doppelt so lang wie dies für Induktionskurven bei Raumtemperatur festgestellt werden kann (vergleiche auch 4.2.3, S. 48). Das Merkmal D der Induktionskurve ist weder bei hohen noch bei tiefen Temperaturen erkennbar.

Aus Abb. 14 ist zu entnehmen, daß nicht alle Induktionsmerkmale gleichermaßen empfindlich auf Temperaturveränderungen reagieren. Die Grundfluoreszenz F_0 erweist sich innerhalb des Temperaturbereiches $4^\circ - 30^\circ \text{ C}$ als völlig unsensibel, erst im Bereich zwischen 30° und 40° C ist an diesem Merkmal eine Veränderung zu erkennen, derart, daß die Intensität von F_0 stark zunimmt.

Anders verhält es sich mit der variablen Fluoreszenz im Merkmal P. F_v nimmt bei tiefer Temperatur die höchste und bei hoher Temperatur die geringste Intensität an. Die Veränderungen erfolgen in nahezu stetiger Abhängigkeit von der Temperatur.

Was den Abfall von $P \rightarrow S$, dargestellt als $F_P - F_S$,
anbelangt, so ist die stärkste Einschränkung bei hoher
Temperatur zu verzeichnen.

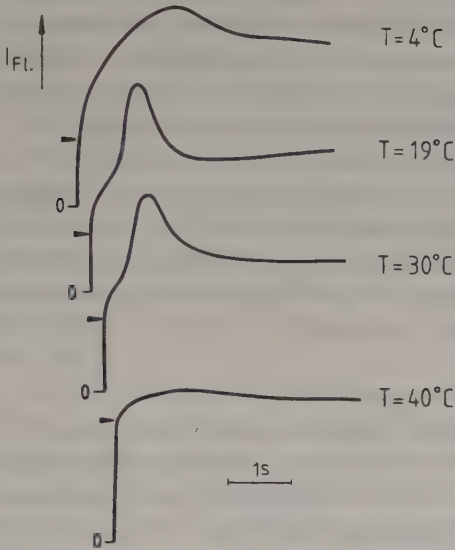


Abb. 13: Die Abhängigkeit der Fluoreszenzinduktion von Moos-
blättern bei unterschiedlichen Temperaturen.
Objekt: Mnium affine.

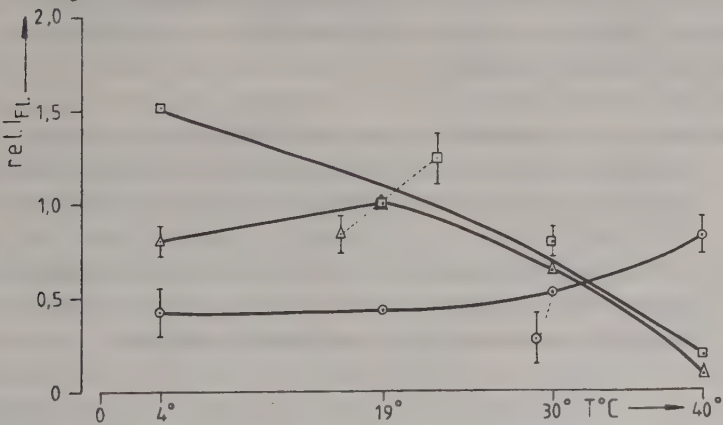


Abb. 14: Die relative Intensität der Fluoreszenz (rel. $I_{Fl.}$)
bei unterschiedlichen Temperaturen.
 $\circ$ rel. $I_{Fl.}$ von F_0 , Bezug: I_F bei $19^\circ C$;
 $\square$ rel. $I_{Fl.}$ von F_v im Merkmal P, Bezug: I_{Fv} bei $19^\circ C$;
 $\triangle$ rel. Intensität des Abfalles von $P \rightarrow S$, Bezug:
 Intensität des $P \rightarrow S$ -Abfalles bei $19^\circ C$;
 Objekt: Mnium affine. n = 20.

4.2.5.3 Diskussion

Mit den vorliegenden Untersuchungen war beabsichtigt, herauszufinden, welchen Einfluß eine Temperaturveränderung auf die Phänomenologie der Fluoreszenzinduktion zu nehmen vermag. Die Experimente erfolgten in sehr weiten Temperaturintervallen, da aufgrund von Vorversuchen abzuschätzen war, daß im Bereich $\pm 4^{\circ}\text{C}$ um Raumtemperatur (20°C) zumindest kurzfristig keine Einflüsse auf die Fluoreszenzinduktion zu beobachten sind. Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, daß selbst eine Temperaturerhöhung auf 30°C den Phänotypus der Induktionskurve kaum verändert.

Obzwar demnach im Temperaturbereich von $16 - 30^{\circ}\text{C}$ nur geringfügige Veränderungen an der Induktionskurve zu beobachten sind, empfiehlt es sich doch, die Raumtemperatur konstant zu halten und möglichst dem Wert, wie er für Kulturbedingungen (siehe 3.1.1, S. 21) gegeben war, anzupassen.

Temperaturextreme, wie 4°C einerseits oder 40°C andererseits, verursachen klar unterscheidbare Veränderungen an der Induktionskurve:

- a) Bei tiefer Temperatur ist die Fluoreszenz im Vergleich zu jener der Raumtemperatur insgesamt intensiviert; unbeeinflusst bleibt die Grundfluoreszenz.
- b) Bei hoher Temperatur ist die Fluoreszenz im Vergleich zu jener bei Raumtemperatur insgesamt reduziert; die Grundfluoreszenz ist diesmal aber erhöht.

Die durch tiefe Temperaturen hervorgerufene Erhöhung der Fluoreszenz hat hinsichtlich ihres Erscheinungsbildes große Ähnlichkeit mit jenem einer Hemmung vom DCMU-Typ. Die Wirkung dieser Substanz wird darin gesehen, daß sie eine Blockierung des Elektronentransportes zwischen dem primären Akzeptor Q und dem Plastoquinon bewirkt (RENGER 1979, PFISTER und ARNTZEN 1979, PFISTER und LICHTENTHALER 1981). Tatsächlich wird verschiedentlich über eine analoge Wirkung durch tiefe Temperaturen berichtet (THORNE und BOARDMAN 1971, ÖQUIST und HELLGREN 1976). Ein indirekter Hinweis für eine Anhäufung reduzierten Q's bei tiefer Temperatur ist die Erhöhung der Fluoreszenz (THORNE und BOARDMAN 1971, SUNDBOM und ÖQUIST 1982, SMILLIE und HETHERINGTON 1983).

Unsere Interpretation zur erhöhten Fluoreszenz im oben beschriebenen Versuch geht deshalb dahin, anzunehmen, daß die Behandlung der Moosblätter mit tiefer Temperatur eine Hemmung des Elektronentransportes zum sekundären Akzeptor des PS 2 verursachte. In Anwendung der Modellvorstellungen zur Energieleitung in den Photosystemen (BUTLER 1978) können wir weiterführend interpretieren. Eine Behinderung der Reoxidation von Q bewirkt eine Anhäufung von $RZ\ 2 \cdot Q^-$. Diese Schreibweise wird heute bevorzugt, da es sehr wahrscheinlich ist, daß Q gewissermaßen ein Bestandteil des Reaktionszentrums ist (PFISTER und ARNTZEN 1979). Aus obigem Ausdruck wird ersichtlich, daß von Seiten des Reaktionszentrums zwar Excitonen aufgenommen, aber nicht photochemisch genutzt werden können. Da, das läßt die hohe Fluoreszenz schließen, der strahlungslose Energieabbau am RZ 2 gering ist, muß deren Transfer zurück ins Antennen-Chlorophyll und den LHCP-Komplex entsprechend groß sein. Ein Transfer zum PS 1 ist unwahrscheinlich, da durch die vorangegangene Dunkelinkubation die Proben sich im state 1 befanden. Es besteht deshalb nur noch die Möglichkeit des

Energieabbaues via Fluoreszenz. Da die Hemmwirkung erst nach Entstehung der Grundfluoreszenz einsetzt, zeigt auch nur der variable Teil der Fluoreszenz Wirkung.

Schwierigkeiten bereitet die Interpretation des verzögerten Anstieges der Fluoreszenz bis zum Merkmal P. Dies ist darauf zurückzuführen, daß in der Literatur zum Thema Kältewirkung keinerlei Anmerkungen den Anstieg zum Merkmal P betreffend zu finden waren. Ein hypothetischer Erklärungsversuch könnte jedoch wie folgt lauten: Die beiden Grundannahmen zur Interpretation seien a) mehrere Reaktionszentren des PS 2 sind gleichzeitig mit einem PQ-Pool verknüpft (MOHR und SCHOPFER 1978), b) die Kälteanwendung war nur von partieller Hemmwirkung. Hieraus läßt sich ableiten, daß gerade wegen der unvollständigen Hemmwirkung den verbliebenen, nicht gehemmten Reaktionszentren nun ein vergleichsweise größerer PQ-Pool zur Verfügung steht als dies bei Raumtemperatur der Fall ist. Eine relative Zunahme des PQ-Pools bedeutet aber nichts anderes, als daß es bis zu dessen Reduktion nun einer längeren Zeit bedarf als vorher. Ein Elektronenstau in Richtung RZ 2, und folglich Zunahme der Fluoreszenz, müßte deshalb zeitlich verzögert eintreten.

Im Zusammenhang mit der Anwendung hoher Temperaturen bei Pflanzen wird von Disfunktionen im Photosyntheseapparat berichtet, die sowohl biochemischer wie auch biophysikalischer Natur sein können (siehe BERRY und BJÖRKMAN 1980). Was die Fluoreszenz betrifft, so sind folgende Punkte bedeutsam:

- 1.) Hohe Temperaturen bewirken eine (funktionale) Trennung der LHCP- und PS 2-Komplexe (ARMOND et al. 1978, SCHREIBER und ARMOND 1978). ARMOND et al. (1980) konnten dies mit Hilfe der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie bei Chloroplasten aus Oleander-Blättern nachweisen.
- 2.) KRAUSE und SANTARIUS (1975) beobachten bei hohen Temperaturen einen Abbau des Protonengradienten mit dem Ergebnis einer eingeschränkten Photophosphorylierung (PEARCY et al. 1977, vergleiche aber auch SANTARIUS 1980).
- 3.) Ebenfalls als temperaturempfindlich wird der wasserspaltende Komplex angesehen (PEARCY et al. 1977).

Im Falle einer temperaturbedingten Trennung der Pigment-Protein-Komplexe ist mit einer Abnahme der Wirksamkeit des Energietransfers sowohl zwischen den Komplexen als auch den in ihnen enthaltenen Chlorophyllmolekülen zu rechnen (ARMOND et al. 1978, SCHREIBER und ARMOND 1978). Die Veränderungen im Energietransfer werden aber unmittelbar durch eine veränderte Fluoreszenzcharakteristik sichtbar (SCHREIBER und BERRY 1977, SMILLIE und HETHERINGTON 1983). Eine Interpretation dieser Veränderungen kann auch hier mit Hilfe des BUTLER-Modells vorgenommen werden: Eine Zunahme der Grundfluoreszenz ist demnach auf eine Veränderung im Antennen- und LHCP-Komplex zurückzuführen. Als Folge dieser Veränderungen wird die Wahrscheinlichkeit eines erfolgreichen Energietransfers sehr gering, so daß die absorbierte Energie im Pigmentsystem "stecken" bleibt. In dieser Phase wird, das zeigt die Zunahme der Grundfluoreszenz, die Energie verstärkt durch Fluoreszenz abgebaut. Was die intensive Fluoreszenzlöschung im Merkmal P angeht,

so ist anzunehmen, daß die Anregungsenergie zwar bis zu den Reaktionszentren gelangen mag, dort aber weder zur Photochemie genutzt noch in die Antenne zurücktransferiert werden kann. Da in den Reaktionszentren ein Energieabbau über die Emission von Fluoreszenzlicht nicht möglich ist (BUTLER 1978), bleibt nur noch die Möglichkeit des Abbaues über strahlungslose Vorgänge (k_d -Prozesse).

Eine Hemmung der Photochemie an den Reaktionszentren unterbindet den Elektronentransport zwischen dem PS 1 und PS 2. Dadurch wird aber auch der Aufbau eines H^+ -Gradienten quer zur Thylakoidmembran verhindert. Eine H^+ -bedingte Fluoreszenzlöschung, wie sie von KRAUSE et al. (1983) als eine wesentliche Ursache für den Abfall der Induktionskurve von P~~...~~ S gefordert wird, kann folglich nicht mehr stattfinden.

Dem Einwand, daß die Anregungsenergie möglicherweise verstärkt auf das PS 1 übertragen wird, so daß hier der Grund für die veränderte Fluoreszenzcharakteristik zu suchen ist, kann folgendes entgegen gehalten werden:

Das System befand sich sowohl zum Zeitpunkt der Hitzeeinwirkung wie auch der Anregung in einem dunkeladaptierten Zustand. Die hieraus abzuleitenden Konsequenzen sind ausführlich in 4.2.4, S. 56 beschrieben. Dort geht aber auch hervor, daß im Falle eines erhöhten Energietransfers auf das PS 1 die Fluoreszenz zwar geringer wird, dies aber alle Merkmale der Induktionskurve betrifft. In unserem Falle wurde aber eine deutlich erhöhte Grundfluoreszenz beobachtet.

Es sei noch zu vermerken, daß eine starke Ähnlichkeit im Erscheinungsbild der Induktionskurven von hitzebehandeltem Material und solchem, welches mit Quinon-Gaben (KITAJIMA und BUTLER 1975), vor allem vom Typ der halogenierten Naphthoquinone (DE KOUCHKOVSKY 1975, PFISTER et al. 1981), ver-

sehen wurde, zu beobachten ist. Die Wirkung dieser Substanz wird darin gesehen, daß sie unmittelbar an den Reaktionszentren des PS 2 künstliche Excitonenfallen bildet, über die ein großer Teil der Anregungsenergie abgebaut wird (KITAJIMA und BUTLER 1975, PFISTER et al. 1981). Im übrigen wird auch von einer Hemmwirkung bei der Bildung des Protonengradienten gesprochen (PFISTER und LICHTENTHALER 1981).

Obzwar wir es hier mit gänzlich unterschiedlichen wirkungerzeugenden Faktoren - physikalischen einerseits, chemischen andererseits - zu tun haben, so ist, abgesehen von der erhöhten F_0 , doch immer derselbe Effekt auf die Induktionskurve zu beobachten. Das liegt aber wohl daran, daß sowohl der physikalisch als auch der chemisch bedingte Effekt der gleichen Ursache zugrunde liegt: In beiden Fällen wird ein hoher Anteil der Anregungsenergie am RZ 2 direkt oder in dessen unmittelbarer Nähe auf thermischen Wege abgebaut.

4.2.6 Entwicklungszustand der Moosblätter

Aus Vorversuchen wurde ersichtlich, daß die unkontrollierte Entnahme von Moosblättern aus den verschiedenen Abschnitten der Moosstaude z. T. starke Streuungen der Fluoreszenzintensität ergaben. Bei der Frage nach der Ursache dieser Streuungen gingen wir von der Annahme aus, daß bei einer willkürlichen Blattentnahme eine Mischung der unterschiedlichsten ontogenetischen Stadien des Blattes zur Messung gelangen. Eine teilweise Begründung dieser Annahme ist durch die Beobachtung gegeben, daß die Blätter in Richtung Staudenspitze deutlich an Größe verlieren. Blattgröße und Entwicklungszustand lassen sich aber durchaus miteinander in Beziehung setzen. Bekanntermaßen zeichnen sich die ontogenetischen Stadien juvenil, adult und seneszent vor allem durch unterschiedliche ultrastrukturelle Gegebenheiten aus (SĚSTÁK 1979). Im folgenden Versuch sind wir der Frage nachgegangen, welchen Einfluß eine bestimmte Insertion respektive Entwicklungsstadium auf die Fluoreszenzinduktion zu nehmen vermag.

4.2.6.1 Methode

Zur Untersuchung wurden Laborkulturen von *Mnium affine* verwendet (siehe 3.1.1, S. 21).

Aus dem Moosrasen wählten wir 10 Moosstauden mit einer durchschnittlichen Länge von 15 cm. Die Stauden wurden in die Abschnitte Basis, Mitte und Spitze unterteilt und jeder Insertion drei Blätter entnommen. Die Anregung der Blätter zur Fluoreszenz erfolgte nach deren Überführung in den dunkeladaptierten Zustand (s. 4.2.4, S. 56)

4.2.6.2 Ergebnisse

Aus Abb. 15 ist zu ersehen, daß die Induktionskurven von Spitzen- und Mittenblättern, die Kinetik betreffend, völlig identisch sind. Ein Vergleich der Induktionskurven von Basisblättern und solchen der beiden anderen Staudenabschnitte läßt jedoch Unterschiede, diesen Punkt betreffend, erkennen. So zeichnen sich die Blätter der Insertionen Spitze und Mitte ausnahmslos durch das Vorhandensein sämtlicher charakteristischer Induktionsmerkmale aus. Den Induktionskurven der Basisblätter fehlt dahingegen das Merkmal D, und der Abfall von $P \rightarrow S$ ist nur sehr schwach ausgebildet.

Untersucht man allerdings die Induktionskurven der Blätter von Spitze, Mitte und Basis hinsichtlich der Intensität ihrer Merkmale, so unterscheiden sich sämtliche Insertionen voneinander (Abb. 16). Die Fluoreszenz von F_o , aber auch die des Merkmals $P(F_p - F_o)$, hat bei Mittenblättern die höchste Intensität. Bei Basisblättern nimmt die Intensität beider Merkmale jedoch Werte an, welche sogar unter denen der Spitzenblätter liegen. Ähnliches Verhalten kann auch für den Abfall von $P \rightarrow S$ genannt werden. Die Mittenblätter zeigen im Vergleich zu den Spitzen- und Basisblättern die stärkste Fluoreszenzabnahme. Bei den Blättern der Basis ist dahingegen die Fluoreszenzabnahme im Vergleich zu den anderen Insertionen am geringsten.

Eine rein visuelle Betrachtung der Blätter der verschiedenen Insertionen zeigt, daß außer den starken Unterschieden in den Flächen zwischen Spitzen- und Mitten- bzw. Basisblättern auch solche farblicher Art zu erkennen sind. Der Farbton des Blattgrüns verändert sich entlang der Entnahmestellen Spitze, Mitte und Basis von hell- über dunkel- zu olivgrün. Wir werten den Wechsel des Farbtones von hell- zu dunkelgrün

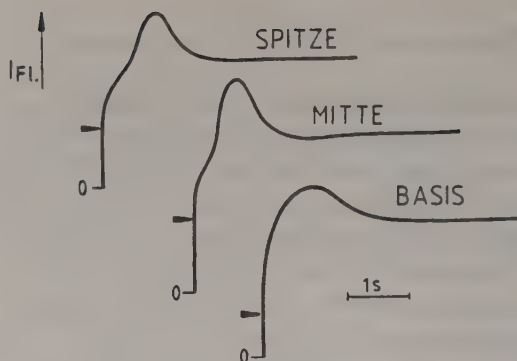


Abb. 15: Die Fluoreszenzinduktion in Abhängigkeit unterschiedlicher Insertionen der Moosblätter. Objekt: *Mnium affine*

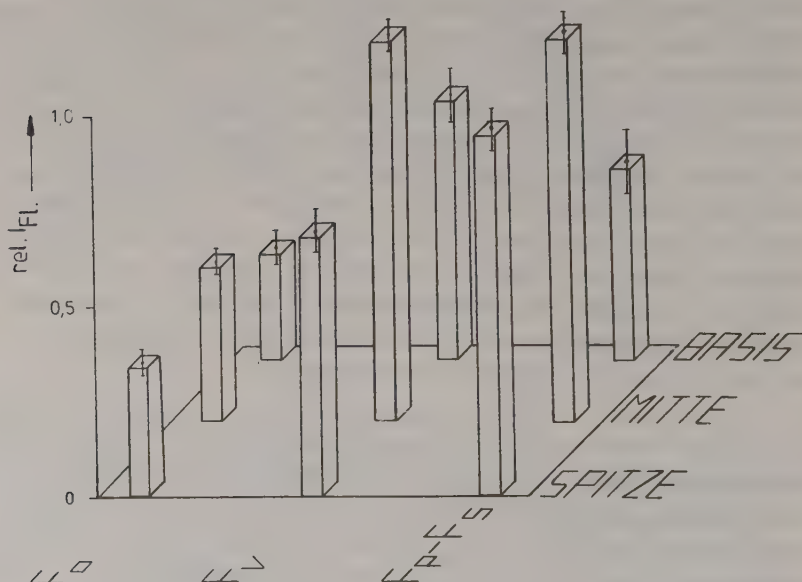


Abb. 16: Die relative Intensität der Fluoreszenz (rel. $I_{Fl.}$) bei Moosblättern unterschiedlicher Insertion. Als Bezug dienten die Werte wie sie für die Insertion Mitte gegeben sind. Objekt: *Mnium affine*, $n = 30$.

als eine Zunahme des Chlorophyllgehaltes. Eine olivgrüne Färbung wird dahingegen als Beginn eines Chlorophyllabbaues angesehen.

4.2.6.3 Diskussion

Mit dem vorliegenden Versuch konnte gezeigt werden, daß es wichtig ist, eine gezielte Entnahme der Moosblätter von den Stauden vorzunehmen. Andernfalls sind sowohl qualitative (Induktionskinetik) als auch quantitative (Merkmalsintensitäten) Unterschiede die Fluoreszenzkurve betreffend in Kauf zu nehmen.

Eine gut erkennbare mehr oder weniger kontinuierliche Abnahme der Blattgrößen in Richtung Staudenspitze führt zu einer Einteilung der Moosstaude in die Bereiche Basis, Mitte und Spitze. Wir setzen weiterhin voraus, daß Blätter aus diesen Insertionsbereichen den ontogenetischen Stadien seneszent, adult und juvenil entsprechen (SESTÁK 1979). Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, daß die Induktionskurven von Blättern der Insertionsabschnitte Spitze und Mitte lediglich quantitative Unterschiede aufweisen. Erst der Vergleich der Blätter aus den beiden vorgenannten Staudenabschnitten mit denen der Basis läßt auch Veränderungen qualitativer Art erkennen.

Zur Interpretation dieser Unterschiede gehen wir davon aus, daß die Fluoreszenzintensität vor allem auch eine Funktion der Chlorophyllkonzentration ist. Das heißt, daß eine schwache Fluoreszenz mit einer geringen Chlorophyllkonzentration und umgekehrt korrelierbar ist. Die im Vergleich zu Blättern des Mittenbereiches geringere Fluoreszenzintensität der Spitzen- und Basisblätter ist folglich auf solche Konzentrationsunterschiede zurückzuführen. Vor allem die in jedem Entnahmeabschnitt veränderte Grundfluoreszenz

spricht für diese Erklärung.

Bekanntlich werden bei juvenilen und seneszenten Blättern die stärksten Veränderungen im Chlorophyllgehalt beobachtet (SEŠTÁK 1979). Allerdings gehen bei jungen Blättern Veränderungen in Richtung Zunahme, bei Blättern, in denen Abbauvorgänge eingesetzt haben, in Richtung Abnahme des Chlorophyllgehaltes (SEŠTÁK 1979, THOMAS und STODDART 1980, BAKER und BRADBURY 1981, JENKINS et al. 1981 b). In der Tat wird von einer synchron verlaufenden Abnahme des Chlorophyllgehaltes und der Fluoreszenzintensität bei alterndem Untersuchungsmaterial berichtet (JENKINS et al. 1981 a, BAKER und BRADBURY 1981).

Vergleichen wir die Induktionskurven der als juvenil bezeichneten Blätter mit Kurven, wie sie für Chloroplastenvorstadien bekannt sind (AKOYUNOGLU 1977), so sind keinerlei Ähnlichkeiten zu erkennen. Wir folgern hieraus, daß die aus dem Spitzenbereich entnommenen Blätter durchaus als juvenil bezeichnet werden können, dieses ontogenetische Stadium jedoch nicht gleichermaßen auch für die Chloroplasten dieser Blätter zutrifft. Vielmehr deuten die gut ausgebildeten Induktionskurven auf ein vollentwickeltes Photosystem hin. Hieraus erklären sich die fehlenden qualitativen Unterschiede zwischen den Induktionskurven von Blättern aus den Insertionen Spitze und Mitte.

Zur Interpretation der veränderten Induktionskinetik bei seneszenten Blättern können mehrere Vorgänge angeführt werden:

- 1.) Nachlassende Photochemie des RZ 2 (HENRY et al. 1982).
Vergleiche aber auch JENKINS et al. (1981 a), die diesen Punkt betreffend anderer Auffassung sind.
- 2.) Abnahme des Elektronentransportes zwischen dem PS 1 und PS 2 (THOMAS 1977, JENKINS et al. 1981 a).

- 3.) Verringerte Effizienz des ATP-Synthesesystems (HERNÁNDEZ-GIL und SCHAEDEL 1973) bzw. Nachlassen der Fähigkeit zur Bildung eines Protonengradienten (HENRY et al. 1982).

Das Erscheinungsbild der Induktionskurven seneszenten Blätter berechtigt zur Annahme, daß sowohl eine eingeschränkte Photochemie des RZ 2 wie auch eine Behinderung bei der Bildung des Protonengradienten vorliegt. Bei eingeschränkter Photochemie erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, daß im PS 2 und dem LHC ein verstärkter Energieabbau stattfindet. Da sowohl im Merkmal O wie auch P eine Löschung der Fluoreszenz zu beobachten ist, kann man folgern, daß der Energieabbau über strahlungslose Prozesse (k_D) erfolgt (BUTLER 1978). Anders als im Falle des hitzebedingten Energieabbaues (Vergleiche 4.2.5.3, S.70) findet hier die Desaktivierung nicht am RZ 2 gemäß eines k_d -Prozesses (BUTLER 1978), sondern bereits in den Pigmentkomplexen statt. Die Annahme, daß ein verstärkter Energietransfer zum PS 1 stattfinden könnte, erscheint unwahrscheinlich, da die Chloroplasten sich zum Zeitpunkt der Anregung im dunkeladaptierten Zustand befanden (siehe 4.2.4, S.56). Die Interpretation des schwachen Abfalls der Fluoreszenz von P $\rightarrow$ S betreffend, ist zu sagen, daß hier im wesentlichen dieselbe Erklärung Gültigkeit hat, wie sie im Falle der Wirkung hoher Temperaturen gegeben wurde. Auch hier kann es nicht zu dem starken, überwiegend dem Protonengradienten anzulastenden Fluoreszenzquench kommen, weil der H^+ -Transport behindert ist. Überdies ist das gesamte System verstärkt auf strahlungslosen Energieabbau eingestellt, so daß ein H^+ -Gradienten bedingter zusätzlicher Quench nicht mehr ins Gewicht fallen würde.

Verschiedentlich wird auch von einer sich verändernden Anstiegszeit der Fluoreszenzintensität bis zum Merkmal P bei den einzelnen ontogenetischen Entwicklungsstufen der Chloroplasten berichtet (AKOYUNOGLU 1977, JENKINS et al. 1981) und mit der Aktivität des PQ-Pools in Verbindung gebracht (HODGES und BARBER 1983).

Was die vorliegende Untersuchung anbelangt, so konnten allerdings keine solchen Veränderungen festgestellt werden. Auffallend ist jedoch, daß bei Basisblättern, und nur dort, das ansonsten gut erkennbare Merkmal D fehlt. Bringen wir uns die Interpretation zu diesem Merkmal in Erinnerung (siehe 2.3, S. 14), so muß dessen Fehlen so gedeutet werden, daß es in dieser Phase weder eine verstärkte PQ-Aktivität noch einen Energietransfer zum PS 1 zu geben scheint. Dies würde aber auch nicht mit der Behauptung in Einklang stehen, daß die Bildung eines transmembranen Protonengradienten behindert ist.

Abschließend kann noch bemerkt werden, daß die Insertionen Spitze, Mitte und Basis durchaus mit den ontogenetischen Stadien juvenil, adult, seneszent übereinstimmen, so man nur die Blattgrößen im Auge hat. Die Unterschiede sind offensichtlich; denn die Spitzenblätter zeigen eine kaum mehr als 1 mm^2 große Fläche, wohingegen diejenigen der Basis bis um das 10-fache größer sein können. Dieselbe Einteilung auf die Chloroplasten der Blätter angewendet, ist nicht ganz korrekt. Dies haben die Induktionskurven der einzelnen Entwicklungsstadien gezeigt. Denn dort wurde ja deutlich, daß die vorgenommene ontogenetische Klassifizierung nur für die Stadien Reife und Seneszenz tatsächlich zutreffend ist.

4.3 Standardmeßbedingungen

Nach der Untersuchung einiger Randgrößen (siehe 4.2, S.41) deren Kenntnis wichtig für eine reproduzierbare und vollständige Induktionskurve ist, können mehrere Punkte zur Beachtung genannt werden:

- a) Es muß definiert werden, welchen ontogenetischen Entwicklungsstadien die Blattproben zuzuschreiben sind. In der vorliegenden Arbeit wurden, außer in 4.2.6, S. 76, ausschließlich dem Stadium der Reife angehörende Blätter verwendet.
- b) Zur Vermeidung von Kammereffekten (O_2 -Verarmung; 4.2.2, S. 43) dürfen einschichtige Moosblätter nicht zwischen Deckglas und Objektträger eingebettet werden.
- c) Das in b) Gesagte gilt vor allem deshalb, weil für eine vollständige Induktionskurve eine 30 Minuten dauernde Dunkelpase notwendig ist.
- d) Für eine vollständige Induktionskurve ist eine Anregung mit sättigenden Lichtintensitäten erforderlich. Entsprechend der in 4.2.3, S. 48 beschriebenen Versuche wurde ausschließlich mit einer Intensität von $1,3 \text{ mW/cm}^2$ angeregt.
- e) Hinsichtlich der Temperatur ist die geringste Einflußnahme zu erwarten, solange bei einer Raumtemperatur um 19°C gearbeitet wird.

Sämtliche Randgrößenuntersuchungen wurden mit Laborkulturen vorgenommen. Es ist dies als ein weiterer Standardisierungspunkt hinzuzufügen.

4.4 Die Beeinflußbarkeit der Chloroplastenfluoreszenz durch SO_2

Die Untersuchung einiger Randgrößen auf die Chloroplastenfluoreszenz erbrachte eine Standardisierung hinsichtlich der Probenvorbehandlung und des Meßablaufes. In einem Modellversuch sollte im folgenden geklärt werden, welchen Einfluß eine SO_2 -Begasung auf die Chloroplastenfluoreszenz zu nehmen vermag. In diesem Zusammenhang erfahren wir etwas über die Eignung der Chloroplastenfluoreszenz zu bioindikativen Zwecken.

4.4.1 Methodik

Als Probenmaterial dienten *Mnium hornum*- und *Mnium affine*-Blätter, welche Laborkulturen entstammten (siehe 3.1.1, S.21). Untersucht wurden gemäß Standardbedingungen (siehe 4.3, S. 83) nur Blätter aus dem Mittenbereich der Moosstauden.

4.4.1.1 Vorbereitung zur Begasung

Von den beiden Moosarten wurden zunächst jeweils 40 Blätter in den dunkeladaptierten Zustand (siehe 4.2.4, S.56) überführt. Danach wurden sämtliche Blätter zur Fluoreszenz angeregt und auf Intensität und Kinetik der Induktionskurve überprüft. Blätter mit sichtbaren Abweichungen von der Norm, die Intensität der Fluoreszenz oder deren Induktionskinetik betreffend, wurden verworfen und durch neue ersetzt. Im folgenden wurden die Moosblätter mengenmäßig so aufgeteilt, daß pro Art 20 Blätter als Kontrolle und 20 Blätter zur Begasung verwendet werden konnten. Die aufgeteilten Blätter wurden

so in je eine Petrischale mit 5 ml entsalztem Wasser gelegt, daß sie auf dem Wasser flottierten. Derart vorbereitet, wurden die in den Petrischalen befindlichen Blätter in je einen mit Wasser (Kontrolle) bzw. mit NaHSO_3 -Lösung gefüllten Glastopf eingestellt (sonstige Bedingungen siehe 3.2, S. 22).

4.4.1.2 Fluoreszenzmessung und Kenngrößen

Die Anregung zur Fluoreszenz und deren Messung erfolgte nach Standardbedingungen (siehe 4.3, S. 83). Für die Konzentrations-Zeit-Kurven wurde die Fluoreszenzintensität im Merkmal O und der variablen Fluoreszenz im Merkmal P ermittelt. Das Verhältnis der Werte von behandelter zu unbehandelter Probe ergibt eine relative Fluoreszenz (vergleiche 4.1.2, S. 37), welche auch als Fluoreszenzschadensindex (FSI) bezeichnet werden kann:

$$\text{FSI} = \text{rel. } I_{F_O, F_V} = \frac{I_{F_O} \text{ bzw. } I_{F_V} \text{ der behandelten Probe}}{I_{F_O} \text{ bzw. } I_{F_V} \text{ der Kontrolle}}$$

Gl. (6)

4.4.1.3 Regenerationsuntersuchungen

Hier war es das Ziel herauszufinden, inwieweit eine Erholung der Fluoreszenzinduktion nach einer SO_2 -Begasung möglich ist. Eine Regeneration sollte dann erfolgt sein, wenn die Induktionskurve einer begasten Probe in Intensität und Form erneut derjenigen einer Kontrolle entspricht. Zu diesem Zweck wurden behandelte und unbehandelte Proben unmittelbar nach dem Begasungsversuch mit entsalztem Wasser

gewaschen und, wie oben bereits beschrieben, in Petrischalen gegeben. Die Blätter wurden sodann 24 Stunden einem Hell-Dunkel-Wechsel von 11 h dunkel : 11 h hell : 2 h dunkel bei ansonsten gleichen Bedingungen, wie für die Begasung beschrieben, unterzogen. Die zum Ende der Erholungsdauer eingeschaltete zweistündige Dunkelphase hatte den Zweck, die Blätter für die Messung vorbereitend in einen dunkeladaptierten Zustand zu überführen.

4.4.2 Ergebnisse

4.4.2.1 Typische Phasen der Begasungswirkung

In Abb. 17 a, b, c sind Induktionskurven von *M n i u m a f f i n e* dargestellt, wie sie sich nach 48 Stunden Begasung mit unterschiedlichen SO_2 -Konzentrationen ergeben. In Abb. 17 a, b sind zur besseren Beurteilung der Grundfluoreszenz zusätzlich die entsprechenden Kurven vom Typ sehr schnelle Induktion (siehe 4.1.1, S. 32) hinzugefügt. Die Kurven der drei Abbildungen repräsentieren jeweils eine von insgesamt drei typischen Phasen der Begasungswirkung.

Phase I: Die Begasung zeigt Wirkung die variable Fluoreszenz im Merkmal P betreffend, indem deren Intensität etwas geringer ist als bei der Kontrolle beobachtet. Der 1. Anstieg ist im Vergleich zur Kontrolle geringfügig beschleunigt.

Phase II: Hier ist eine Erhöhung der Grundfluoreszenz und eine Beschleunigung des 1. Anstieges zu erkennen. Die Fluoreszenz im Merkmal P ist stark reduziert.

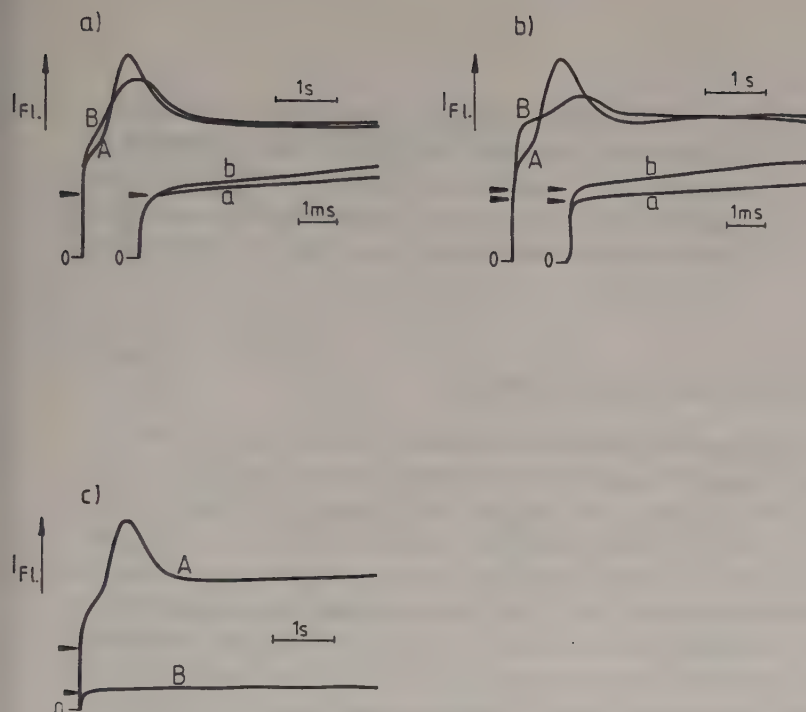


Abb. 17: Die Fluoreszenzinduktion bei Blättern von *Mnium affine* nach einer Begasung mit SO_2 unterschiedlicher Konzentration.

- a) A, a Kontrolle; B, b Begasung: 48 h, 0,5 mg SO_2/m^3 Luft (Wirkphase 1).
- b) A, a Kontrolle; B, b Begasung: 48 h, 1,6 mg SO_2/m^3 Luft (Wirkphase 2).
- c) A Kontrolle; B Begasung: 48 h, 3,2 mg SO_2/m^3 Luft (Wirkphase 3).

Für sämtliche Untersuchungen gelten Standardmeßbedingungen.

Phase III: In dieser Phase ist die Fluoreszenz in ihrer Intensität insgesamt reduziert. Die Grundfluoreszenz ist diesmal auch ohne sehr schnelle Induktion erkennbar stark abgesenkt. Alle anderen Induktionsmerkmale sind vollständig eliminiert.

4.4.2.2 Konzentrations-Zeit-Kurven

Eine Einteilung der Begasungswirkung in drei Stufen läßt sich auch aus den Konzentrations-Zeit-Kurven der Abb. 18 a, b herauslesen. In den Abbildungen sind sowohl die Ergebnisse für *M n i u m a f f i n e* wie auch *M. h o r n u m* dargestellt. Wir erkennen, daß bei geringen SO_2 -Konzentrationen die Grundfluoreszenz sich über einen langen Begasungszeitraum als sehr konstant erweist (Abb. 18 a), während zur gleichen Zeit die variable Fluoreszenz (Abb. 18 b) eine deutliche Abnahme der Intensität zeigt. Weiterhin ist aus den Kurven zu entnehmen, daß eine geringe Begasungskonzentration über einen langen Zeitraum appliziert zu einer Erhöhung der Grundfluoreszenz bei gleichzeitiger Abnahme der variablen Fluoreszenz führt.

Anders verhält es sich bei der Anwendung hoher SO_2 -Konzentrationen. In einem solchen Fall sind schon nach kurzer Begasungsdauer ($< 6 \text{ h}$) sowohl die Grund- als auch die variable Fluoreszenz in ihrer Intensität reduziert. Jedoch auch hier erfolgt die Intensitätsabnahme bei der variablen Fluoreszenz rascher als bei der Grundfluoreszenz.

Die Ergebnisse für die beiden *M n i u m* - Arten sind nicht grundsätzlich voneinander verschieden. Es geht aber aus den Kurven hervor, daß bei *M n i u m h o r n u m* die Effektbildung vor allem bei geringen bis mittleren Begasungskonzentrationen später einsetzt als bei *M n i u m a f f i n e*.

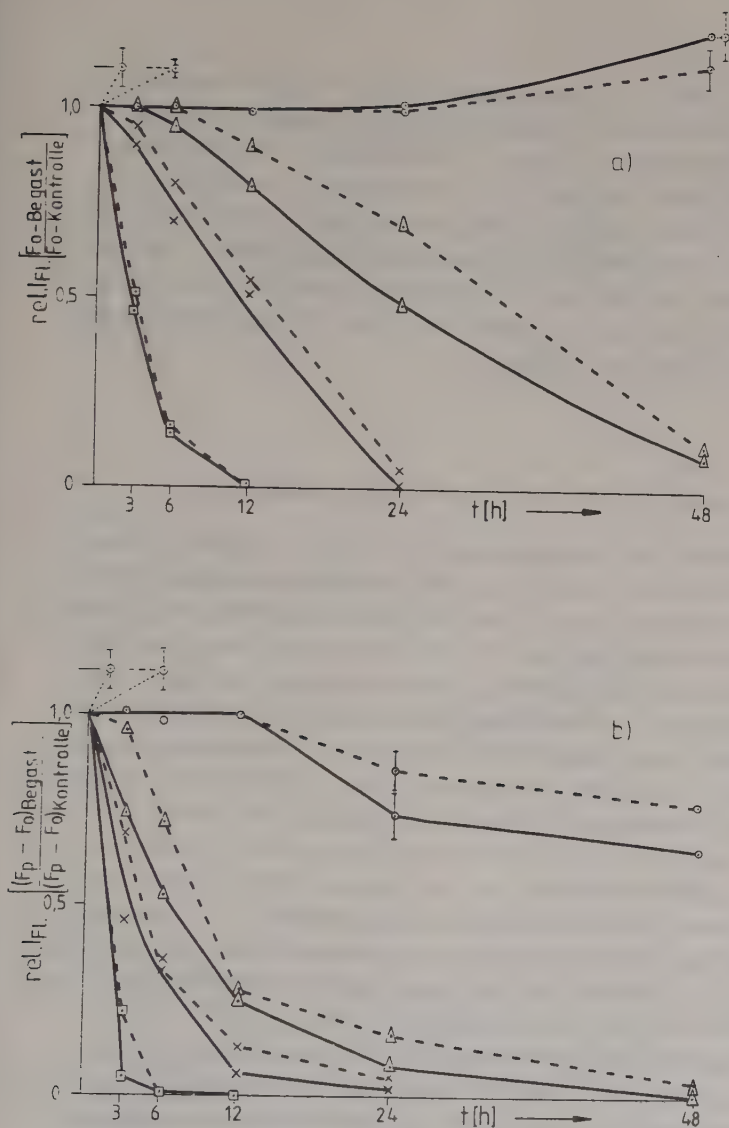


Abb. 18: Die relative Intensität der Fluoreszenz (rel. I_{F1}) bei Moosblättern nach einer SO_2 -Begasung unterschiedlicher Dauer und Konzentration.
a) rel. I_{F1} von F_0 , b) rel. I_{F1} von F_p ;
— : Mnium affine , ---- M. hornum . SO_2 -Konzentrationen in mg/m^3 Luft: $\circ$ 1,6; $\triangle$ 3,2; $\times$ 4,8; $\square$ 15,6.
Für sämtliche Untersuchungen gelten Standardmeßbedingungen; $n = 20$.

Unmittelbar auf die Fluoreszenzmessung folgend wurden stichprobenartig mikroskopische Überprüfungen zum zytologischen Zustand der Blätter vorgenommen. In diesem Zusammenhang waren Blätter mit in der Phase I und II befindlichen Chloroplasten hinsichtlich ihres Erscheinungsbildes nicht von den Kontrollen zu unterscheiden. Blätter mit in Phase III befindlichen Chloroplasten zeigten dahingegen häufig Zellen, in denen sich das Protoplasma von den Zellwänden losgelöst hatte.

4.4.2.3 Regeneration der Fluoreszenzinduktion

Die Bedeutung von Erholungszeiten für die Chloroplastenfluoreszenz nach einer Begasung wird anhand zweier Beispiele gezeigt (Abb. 19 a, b). Im ersten Beispiel (Abb. 19 a) sind Induktionskurven gegeben wie sie nach einer Begasung von vergleichsweise geringer SO_2 -Konzentration entstehen. Es ist zu erkennen, daß Proben, welche einer Erholung ausgesetzt waren, eine Zunahme der variablen Fluoreszenz im Merkmal P aufweisen, ohne jedoch vollständig den Wert der Kontrolle zu erreichen. Im zweiten Beispiel (Abb. 19 b) ist die Wirkung einer höheren Begasungskonzentration aufgezeigt. Nach 24 h Erholungsdauer ist bei diesen Proben keine Regeneration der Fluoreszenzinduktion erkennbar. Im Gegenteil, die Begasungswirkung hat sich fortgesetzt und hat zu einer sehr starken Abnahme der Fluoreszenzintensität geführt; Induktionsmerkmale sind nicht mehr zu erkennen.

Die mikroskopische Beobachtung der Proben läßt im ersten Beispiel keine zellulären Veränderungen erkennen, wohl jedoch im zweiten Beispiel. Dort ist bei allen Zellen das Protoplasma von der Zellwand abgelöst und liegt klumpenartig verdichtet in der Zellmitte. Das gesamte Blatt hat eine olivgrüne bis gelbliche Farbe angenommen.

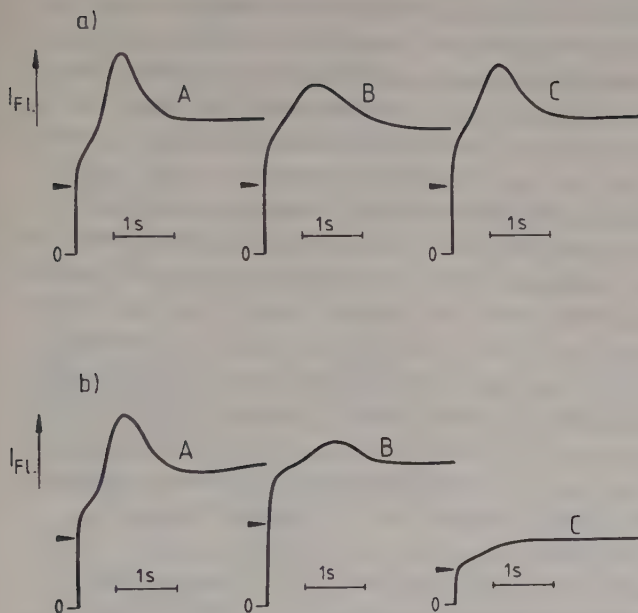


Abb. 19: Die Regeneration der Fluoreszenzinduktion nach einer SO_2 -Begasung.

a) A: Kontrolle, B: Begasung (48 h, $0,5 \text{ mg SO}_2/\text{m}^3$ Luft), C: wie B, jedoch nach Erholung.

b) A: Kontrolle, B: Begasung (48 h, $1,6 \text{ mg SO}_2/\text{m}^3$ Luft), C: wie B, jedoch nach Erholung.

Für sämtliche Untersuchungen gelten Standardmeßbedingungen. Objekt: *Mnium affine*.

4.4.3 Diskussion

Bei den beschriebenen Begasungsversuchen wurde so verfahren, daß die Moosblätter auf entsalztem Wasser flotierten. Mit dieser Vorgehensweise konnte den natürlichen Erfordernissen von Moosen am besten Rechnung getragen werden. Moose besitzen weder Spaltöffnungen für einen Gasaustausch noch ein spezielles Gefäßsystem für einen Wasser- und Nährstofftransport. Sie benutzen dazu vielmehr die gesamte Blattoberfläche (siehe 1, S. 2). Dies hat aber zur Folge, daß Emissionen, wie z. B. das SO_2 , welches sehr leicht in Wasser löslich ist, von der Pflanze direkt aus dem angesäuerten Niederschlags- oder Oberflächenwasser aufgenommen wird (FRAHM 1977). Dissoziationsprodukte wie H^+ , H_2SO_3^- und SO_3^{2-} akkumulieren im Zellsaft (PUCKETT et al. 1973) und SO_3^{2-} wird bevorzugt in die Thylakoidmembran eingebaut (ZIEGLER und HAMPP 1977). Es liegt deshalb nahe, anzunehmen, daß der Chloroplast der eigentliche Ort des SO_2 -Angriffes ist (JÄGER und KLEIN 1980).

Die Ergebnisse der Chloroplastenfluoreszenz lassen drei Phasen der Begasungswirkung erkennen. In Phase I zeigt die Induktionskurve lediglich Veränderungen die variable Fluoreszenz betreffend an. In den beiden anderen Phasen werden dahingegen auch solche für die Grundfluoreszenz erkennbar. Hier zeigt es sich auch, daß die im allgemeinen schwer zu beeinflussende Grundfluoreszenz sowohl eine Zunahme (Phase II) als auch eine starke Abnahme der Intensität (Phase III) erfahren kann.

Die typischen Effektausbildungen machen sich auch bei Konzentrations-Zeit-Kurven bemerkbar. Diese Art der Ergebnisdarstellung läßt erkennen, daß nur bei bestimmten Kombinationen von Konzentration und Zeit eine bestimmte begasungsbedingte Effektausbildung zutage tritt. Eine erhöhte Grundfluoreszenz wurde z. B. nur bei geringen bis mittleren Konzentrationen, langfristig appliziert, beobachtet. Es handelt sich dabei

offensichtlich um Konzentrations-Zeit-Kombinationen, die geeignet sind, chronische Schädwirkungen hervorzurufen (GUDERIAN und VAN HAUT 1970). Eine reduzierte Grundfluoreszenz stellt sich andererseits schon nach kurzfristiger Anwendung hoher Konzentrationen ein, was einer Kombination entspricht, bei welcher akute Schädwirkungen erzeugt werden (GUDERIAN und VAN HAUT 1970).

Im folgenden wird der Versuch unternommen, die Ursachen der Effektbildung bei den einzelnen Phasen der Begasungswirkung zu interpretieren:

Phase I: Eine Beschleunigung des 1. Anstieges der Induktionskurve, auch in Phase II beobachtbar, kann als das Ergebnis einer im Vergleich zur Kontrolle rascher ablaufenden Reduktion des primären Akzeptors Q gewertet werden (VAN GORKOM 1977, MELIS und DUYSENS 1979). Den Grund für eine beschleunigte Reduktion sehen SHIMAZAKI und SUGAHARA (1979, 1980) darin, daß eine SO_2 -Begasung zur Abnahme der Größe des Q-Pools führt. Man kann sich vorstellen, daß dann die Relation der Menge von Reaktionszentren zur Menge des primären Akzeptors zuungunsten von Q verschoben ist. Im Antennensystem entsteht aus diesem Grunde, rascher als üblich, ein Excitonenstau, welcher als Fluoreszenz abgebaut wird. Die Beschleunigung des 1. Anstieges kommt im Grunde der Wirkung von DCMU gleich. Ein wesentlicher Unterschied besteht allerdings darin, daß im vorliegenden Fall für die Fluoreszenz im Merkmal P eine Löschung beobachtet wird, bei DCMU aber gerade das Gegenteil zu erwarten ist. Zur Erklärung des Quenches von F_v in P muß deshalb die Annahme vorausgesetzt werden, daß die Reaktionszentren in diesem Fall ihren Elektronenbedarf nicht nur aus der Wasserspaltung decken, sondern noch andere Quellen zur Verfügung stehen. LIBERA et al. (1973, 1975) ziehen die Möglichkeit, daß SO_3^{2-} die Eigenschaft eines

e^- -Donors haben könnte, in Betracht. Eine solche Funktion des SO_3^{2-} hätte zur Folge, daß die Reaktionszentren trotz Mangel an Q ständig zur Aufnahme von Excitonen bereit wären, ohne aber die Energie photochemisch nutzen zu können. Nach den Vorstellungen von BUTLER (1978) muß nun die Energie nicht notwendigerweise in das Antennensystem zurücktransferiert werden, sondern kann unmittelbar an den Reaktionszentren strahlungslos (k_d -Prozeß) abgebaut werden. Aus dem Modell von BUTLER (1978) ist auch zu entnehmen, daß in solch einem Fall die Grundfluoreszenz unverändert bleibt (siehe 2.2, S. 7).

Eine andere Art der Interpretation ist durch die Überlegung gegeben, daß wegen einer Abnahme des Q-Pools diesem nun ein größerer PQ-Pool zur Verfügung steht. Mit dieser Überlegung läßt sich, wie im Falle der Annahme SO_3^{2-} könnte e^- -Donor sein, das Nachlassen der Fluoreszenz im Merkmal P erklären. Eine Einschränkung ist jedoch insofern zu vermerken, als daß ein zu erwartender verzögerter Anstieg der Fluoreszenz zum Merkmal P nicht beobachtet werden konnte. Da dieser Effekt jedoch in Phase II deutlich sichtbar ist, liegt in Phase I möglicherweise die Kombination einer e^- -Donorfunktion des SO_3^{2-} und einer relativen Zunahme des PQ-Pools vor. Aus den vorgenannten Überlegungen ableitend, ist die SO_2 -Wirkung der Phase I, trotz einer gewissen Regenerierbarkeit der Induktionskurve, als Beginn einer Schädigung einzustufen.

Phase II: Für die Erhöhung der Grundfluoreszenz können zweierlei Ursachen verantwortlich gemacht werden:

- 1.) Zwischen den LHCP- und PS 2-Komplexen sowie den Chlorophyllmolekülen selbst kommt es aufgrund der Begasung zu einer funktionalen Trennung. Hieraus würde ein Nachlassen der Wirksamkeit des Energietransfers zwischen und in den Pigmentsystemen resultieren. Als Konsequenz darf eine Zunahme der Grundfluoreszenz erwartet werden, wie es ähnlich im Fall hoher Temperaturen schon einmal beobachtet wurde (vergleiche 4.2.5, S. 67). Eine funktionale Trennung der Pigmentsysteme ist durchaus denkbar, wenn man berücksichtigt, daß vielfach von Thylakoidschwellungen nach SO_2 -Begasung berichtet wurde (WELLBURN et al. 1972, FISCHER et al. 1973, MALHOTRA 1976, WONG et al. 1977).
- 2.) Die Reaktionszentren sind geschlossen, weil der primäre Elektronen-Donor durch die Begasung inaktiviert wurde (SHIMAZAKI und SUGAHARA 1980). LIBERA et al. (1973, 1975) berichten ebenfalls von Hinweisen für eine begasungsbedingte Hemmung des Elektronentransportes auf der Seite des wasserspaltenden Komplexes. Auch in diesem Fall muß mit einer Zunahme der Grundfluoreszenz gerechnet werden.

Zur Interpretation der zu beobachtenden Beschleunigung des 1. Anstieges und der starken Abnahme der Fluoreszenz im Merkmal P können dieselben Erklärungen, wie in Phase I bereits angeführt, verwendet werden. Hier erfährt, wegen der Verzögerung des Fluoreszenzanstieges zum Merkmal P, die Annahme einer relativen Zunahme des PQ-Pools eine Bestätigung.

Phase III: Obwohl dunkeladaptiert, ist in dieser Phase keinerlei Anzeichen einer variablen Fluoreszenz der Proben erkennbar. Darüber hinaus ist die Grundfluoreszenz in ihrer Intensität stark abgesenkt. All dies kann nur so gedeutet werden, daß ein Stadium der Begasungswirkung erreicht ist, welches schwere Schäden in den Photosystemen offenbart. So kann das Nachlassen der Intensität von F_0 nur als das Ergebnis eines fortgeschrittenen Chlorophyllabbaues interpretiert werden. Von derartigen Schädwirkungen des SO_2 ist vielfach berichtet (RAO und LEBLANC 1965, PUCKETT et al. 1973, HENRIKSSON und PEARSON 1981) und kritisch die Bedeutung des Chlorophyllabbaues für bioindikative Zwecke diskutiert worden (ARNDT 1971, RABE 1978, BECKLEY und HOFFMAN 1981). In Phase III ist somit ein Stadium der Schädigung erreicht, in dem die Eigenschaft des Chlorophylls zu fluoreszieren weitgehend verlorengegangen ist. Unter solchen Gegebenheiten ist es verständlich, daß eine intensitätssteuernde Wirkung der Komponenten des Elektronentransportes, so diese überhaupt noch intakt sein sollten, nicht mehr ins Gewicht fallen kann.

Die Schädwirkung des SO_2 ist von den jeweiligen experimentellen Bedingungen abhängig. So ist bekannt, daß SO_2 -begaste Pflanzen im Licht wesentlich stärker geschädigt werden als im Dunkeln (SHIMAZAKI et al. 1980). Als Ursache hierfür wird die in Anwesenheit von Licht und SO_3^{2-} verstärkte Bildung reaktiver Sauerstoffradikale genannt (TANAKA und SUGAHARA 1980, SHIMAZAKI et al. 1980, PEISER et al. 1982, TANAKA et al. 1982). Es ist die Eigenschaft solcher Sauerstoffprodukte, Membrankomponenten wie Lipide und vor allem Photosynthesepigmente oxidativ zu zerstören (FOYER und HALL 1980, RABINOWITCH und FRIDOVICH 1983, SAKAKI et al. 1983). Man kann deshalb zu dem Schluß kommen, das eigentlich Toxische des SO_2 , zumindest teilweise, darin zu sehen, daß es die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale

begünstigt (SHIMAZAKI und SUGAHARA 1980, SHIMAZAKI et al. 1980). Der für Phase III aufgrund starken Nachlassens der Fluoreszenz angenommene Chlorophyllabbau kann folglich durch die Bildung von Sauerstoffradikalen verursacht sein; dies zumal die Begasung im Licht erfolgte.

Die unmittelbar nach Begasung vorgenommene mikroskopische Untersuchung einzelner Proben auf Schadwirkung erbrachte, außer für Phase III, keinerlei Resultate. Anders die Induktionskurve, aus deren Veränderung lange vor Sichtbarwerden eines Schadens die Begasungswirkung deutlich abzulesen ist. Dies unterstreicht die Bedeutung der Fluoreszenzinduktion bei der Früherkennung von Schäden im Photosyntheseapparat.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Regenerierbarkeit der Induktionskurve nach SO_2 -Begasung sind nicht in jedem Falle eindeutig interpretierbar. So ist bei Proben mit geringen begasungsbedingten Veränderungen der Induktionskurve nicht zu entscheiden, ob tatsächlich eine Erholung stattgefunden hat. Zwar kann eine, wenn auch nur schwache, Zunahme der variablen Fluoreszenz beobachtet werden, die Intensität der Kontrolle wird jedoch nicht wieder erreicht. Die Ergebnisse lassen aber immerhin vermuten, daß die Begasungswirkung zum Stillstand gekommen ist.

Eindeutig sind dahingegen die Ergebnisse für hohe Begasungskonzentrationen. Hier ist trotz der Möglichkeit zur Erholung ein Fortschreiten der SO_2 -Wirkung zu verzeichnen. Die starke Abnahme der Fluoreszenzintensität kann als fortgeschrittener Chlorophyllabbau gewertet werden. Als eine Ursache für den Fortgang der Schädigung darf die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale angenommen werden, zumal die Moosblätter während der "Erholung" einem Hell-Dunkel-Wechsel ausgesetzt waren.

5. MODELLÜBERLEGUNGEN ZUR STRUKTUR UND STABILITÄT DES CHLOROPLASTEN

5.1 Einleitung und Problemauswahl

In den vorangegangenen Kapiteln ist die Wirkung einiger Randgrößen und einer SO_2 -Begasung (Milieuparameter) auf den Chloroplasten untersucht worden. Dies geschah in der Absicht, herauszufinden, wie der Chloroplast - im folgenden auch als das System bezeichnet - auf diese Milieuparameter reagiert. Die Reaktion des Systems wurde mit Hilfe einer einzigen, aber wesentlichen, den Zustand des Systems kennzeichnenden Größe (Zustandsvariable), der Chloroplastenfluoreszenz, untersucht. Die Eigenschaften der Zustandsvariablen sind eingehend in dieser Arbeit erörtert worden. Bei allen Untersuchungen ist bewußt auf eine Kombination der Milieuparameter verzichtet worden. Unser Interesse bestand darin, zu erfahren, welche der Milieuparameter im Hinblick auf die Kenntnis der Wirkung einer SO_2 -Begasung auf alle Fälle konstant zu halten oder gar auszuschalten sind.

Es wurde also ein komplexes System anhand eines intrinsischen Signals (Fluoreszenz) unter kontrollierten Bedingungen untersucht. Mit Hilfe bereits vorhandener Modelle zur Photosynthesemembran war es möglich, Effekte nicht nur phänomenologisch zu beschreiben, sondern auch ursächlich interpretieren zu können.

Im folgenden Kapitel wird der Versuch unternommen, anhand eines Theorieansatzes "the sketch of a theorie" (SCHWEGLER 1981) ein Denkmodell zum Chloroplasten zu entwerfen. Der Theorieansatz wurde von SCHWEGLER (1981) in Zusammenarbeit mit dem Forschungsschwerpunkt Stabilitätsgrenzen biologischer Systeme an der Universität Bremen formuliert. Die Grundgedanken des Theorieansatzes sind folgende: Es soll die Möglichkeit gegeben sein, eine einheitliche Beschreibung

a) der Struktur und Organisation von Systemeigenschaften und b) der Stabilität bzw. Instabilität dieser Strukturen und ihrer Organisation vornehmen zu können.

Da die Theorie strenggenommen nur für sogenannte selbst-erhaltende Systeme volle Gültigkeit besitzen soll (SCHWEGLER 1981), mag es interessant sein, herauszufinden, aufgrund welcher Theoriepunkte die Beschreibung des semi-autonomen Systems Chloroplast Schwierigkeiten bereitet.

5.2 Problemformulierung

Es ist beabsichtigt, eine Zustandsbeschreibung des Chloroplasten im Sinne der Theorie von SCHWEGLER (1981) vorzunehmen. In diesem Zusammenhang sind mehrere Fragen zu beantworten:

- a) Ist es möglich, für den Chloroplasten einen Gleichgewichtszustand seiner Zustandsgrößen (Climax-Struktur) zu definieren?
- b) Welche Aussagen zur Stabilität sind bezüglich eines solchen Gleichgewichtszustandes möglich?
- c) Wie verändert sich der Gleichgewichtszustand und seine Stabilität, wenn sich ein bestimmter Milieuparameter ändert?

Um jede der drei Fragen gruppiert sich eine ganze Reihe untergeordneter Fragen, die hier jedoch keine Auflistung erfahren sollen.

5.3 Modellansatz und Systemeingrenzung

Zur Entwicklung der Modellvorstellungen genügt es, mit zwei Zustandsvariablen in die Überlegungen einzusteigen. Dies ist aber auch das Minimum mit dem eine Climax-Struktur gerade noch graphisch darstellbar ist. Was die Werteentwicklung der Variablen anbelangt, so liegen nur teilweise empirische Erkenntnisse vor. Aus diesem Grund ist es notwendig, eine Reihe theoretischer, aber durchaus plausibler, Annahmen zu machen.

Von einer Vielzahl möglicher Zustandsvariablen hat sich, dies haben die vorangegangenen Versuche gezeigt, die Chloroplastenfluoreszenz (Fl.) als geeignet erwiesen. Als eine weitere, vor allem im Zusammenhang mit der Fluoreszenz, wesentliche Variable soll die Sauerstoffentwicklung (O_2) genannt werden. Sauerstoffentwicklung und Chloroplastenfluoreszenz sind gleichermaßen geeignet, die Funktionsfähigkeit der gesamten Photosynthese zu beschreiben.

Es wird vorausgesetzt, daß die Chloroplastenfluoreszenz eine Funktion der Lichtintensität ist. Unter stationären Milieubedingungen mündet die Werteentwicklung von $I_{Fl.}$ in einen steady state, F_T (BRADBURY und BAKER 1981). Die Intensität von F_T ist dann nur gering von F_0 verschieden (KLOCKARE et al. 1979). Des weiteren gelte die Annahme, daß $I_{Fl.}$ im steady state, innerhalb gewisser Grenzen, ähnlich wie für I_{F_0} bereits bekannt (vergleiche Abb. 9, S. 50), ein zur Lichtintensität proportionales Verhalten aufweist (KJELSTAD und MELÖ 1983).

Auch die Sauerstoffentwicklung kann als eine Funktion der Lichtintensität angesehen werden (HOLZAPFEL und BAUER 1975). Die Werteentwicklung verläuft invers zu jener der Chloroplastenfluoreszenz.

Für die Werteentwicklung der Variablen wird sowohl der dunkel- als auch lichtadaptierte Systemzustand berücksichtigt. Dementsprechend erhalten wir bei Belichtung des Chloroplasten im dunkeladaptierten Zustand für beide Variablen eine Induktion, die in besagten steady state mündet. Eine Belichtung im lichtadaptierten Zustand erbringt dahingegen kein Induktionsphänomen; die Werte der Systemvariablen entsprechen bereits unmittelbar nach Belichtung dem steady state (siehe Abb. 20 b,b' sowie Abb. 11).

Der Beobachtungszeitraum, innerhalb dessen die Werteentwicklung der Variablen von Interesse ist, soll 6 Minuten nicht wesentlich überschreiten; dies ist ein Zeitbedarf, wie er etwa für eine LHCP-Phosphorylierung, die eng im Zusammenhang mit der Bildung eines steady state zu sehen ist, veranschlagt wird (HORTON und BLACK 1981).

Die verschiedenen Altersstufen des Chloroplasten bezeichnen wir als Juvenilität, Adultstadium und Seneszenz. Jede Altersstufe ist durch unterschiedliche Chlorophyllkonzentrationen gekennzeichnet (BRADBURY und BAKER 1981) und zeigt eine dementsprechende Fluoreszenzintensität (vergleiche hierzu 4.2.6, S. 76). Chlorophyllgehalt und Fluoreszenzintensität sollen in der Reihenfolge Seneszenz < Juvenilität < Adultstadium zunehmen. Den Sonderfall des Wiederergrünens ordnen wir willkürlich zwischen die Stadien adult und juvenil ein.

Von den Milieuparametern ist das Licht als einer der wichtigsten zu nennen. Für die Gedankenexperimente sollen die Intensitätsstufen I, 1,3 I, 1,6 I und >300 I verwendet werden.

Zur Systemeingrenzung läßt sich folgendes sagen:

- Der Chloroplast ist von einer Hüllmembran umgeben. Diese sorgt für die Abgrenzung eines Innenraumes von einem Außenraum (Milieu).
- Zwischen Innenraum und Milieu findet ein ständiger Stoff- und Energieaustausch statt. Das System ist energetisch und materiell offen.
- Einer der wichtigsten Milieuparameter ist das Strahlungsfeld der Sonne.
- Der Chloroplast ist energetisch autark, aber genetisch semiautonom (WOLLGIEHN und PARTHIER 1980).

Aus der Aufzählung wird ersichtlich, daß der Chloroplast einige Voraussetzungen erfüllt, andere nicht, um als selbsterhaltendes System gelten zu können.

5.4 Das System im stationären Milieu

Um herauszufinden, ob sich für die beiden Zustandsvariablen eine Climax-Struktur definieren läßt, ist es notwendig, das System vom Idealfall der stationären Milieubedingungen ausgehend zu betrachten.

Der entscheidende Milieuparameter im Hinblick auf die Sauerstoff- und Fluoreszenzentwicklung ist das Licht. In Abb. 20 a ist die für die Fluoreszenz bereits bekannte Werteentwicklung eines dunkeladaptierten Systems nach Einschalten einer konstanten Lichtquelle der Intensität 1,6 I aufgezeigt.

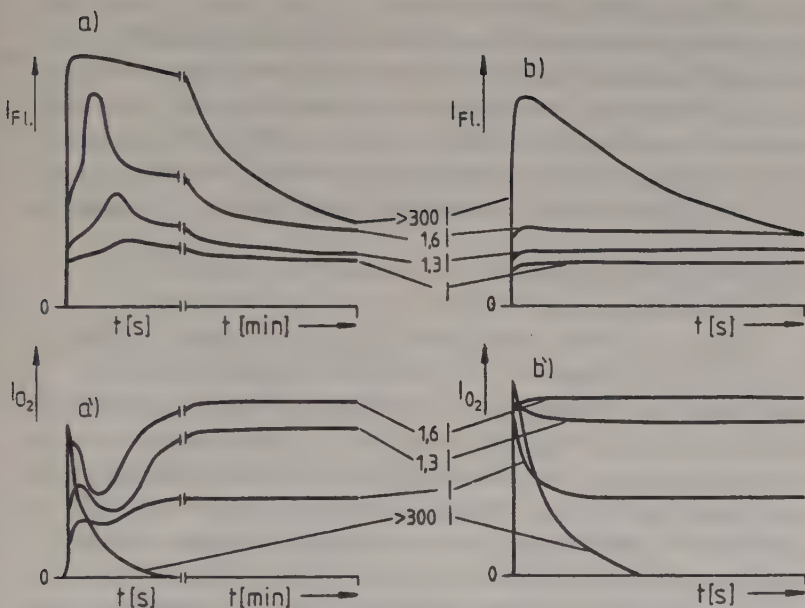


Abb. 20: Annahmen zur Abhängigkeit der Fluoreszenz und Sauerstoffentwicklung von unterschiedlichen Lichtintensitäten.

a), a') Intensität der Fluoreszenzinduktion bzw. Sauerstoffentwicklung im dunkeladaptierten Systemzustand.

b), b') wie a), a'), jedoch im lichtadaptierten Zustand;

I = rel. Intensität des anregenden Lichtes.

Darunter ist in Abb. 20 a' für denselben Zeitraum die Sauerstoffentwicklung dargestellt.

Fluoreszenzintensität und Sauerstoffentwicklung zeigen gegenläufiges Verhalten. Bei intensiver Fluoreszenz ist die Sauerstoffentwicklung gering und umgekehrt. Nach wenigen Minuten der Belichtung hat das System einen lichtadaptierten Zustand erreicht, in dem die beiden Zustandsvariablen einen steady state anzeigen.

In einem Phasendiagramm sind die beiden Variablen zueinander in Beziehung gesetzt (Abb. 21 c). Der Kurvenzug, mit dem ihre gemeinsame Werteentwicklung verbunden werden kann, ist eine Trajektorie. Sie hat ihren Ausgangspunkt auf der Achse der Fluoreszenz, dem Wert der Grundfluoreszenz (F_0) entsprechend. Dies hängt damit zusammen, daß innerhalb des Zeitraumes der Entstehung der Grundfluoreszenz der wasserspaltende Komplex noch nicht aktiviert ist. Die Trajektorie mündet in einen bevorzugten Bereich des Phasendiagrammes und verbleibt dort. Wir identifizieren diesen Bereich als die Climax-Struktur der Zustandsvariablen Fluoreszenz und Sauerstoffentwicklung.

Bislang wurde nur der Fall des dunkeladaptierten Systems berücksichtigt. Aus 4.2.4, S. 56 ist jedoch bekannt, daß es auch einen lichtadaptierten Zustand geben kann. Es stellt sich die Frage nach dem Trajektorienverlauf, wie er für diese Situation charakteristisch ist. In Abb. 20 b, b' ist deshalb die Werteentwicklung der beiden Variablen ($Fl.$, O_2) für das Stadium der Lichtadaptation dargestellt. Wir sehen den aus Abb. 11 (S. 60) bereits bekannten zeitlichen Verlauf der Fluoreszenz. Gemäß der Vorgabe eines spiegelbildlichen Verhaltens der Zustandsvariablen setzt die O_2 -Entwicklung in diesem Fall schon unmittelbar nach Entstehung der Grundfluoreszenz mit steady state-

Intensität ein. Die Trajektorie beginnt wieder im Niveau von F_0 und mündet auf direktem Wege in denselben, bereits angesprochenen, bevorzugten Bereich des Phasendiagramms. Beide Trajektorien begrenzen nun eine Fläche, innerhalb welcher der Verlauf, durch die beiden Variablen bestimmter Trajektorien, zu denken ist. Die trajektorienumschlossene Fläche identifizieren wir als das Bassin, aus dem die Climax-Struktur ihre Werte bezieht.

5.4.1 Die Stabilität/Instabilität der Climax-Struktur

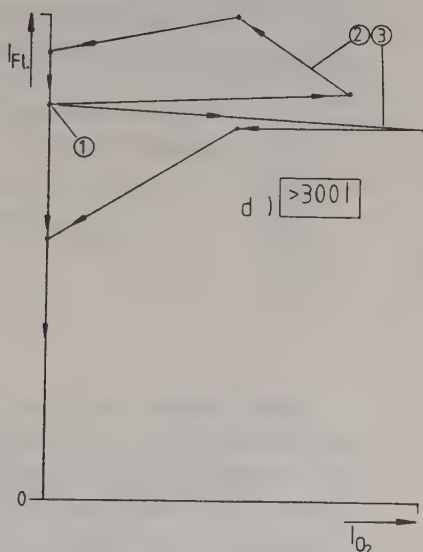
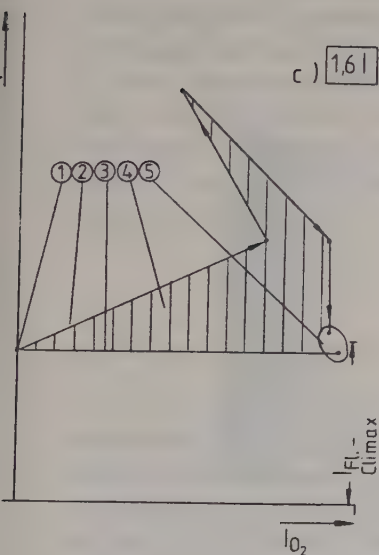
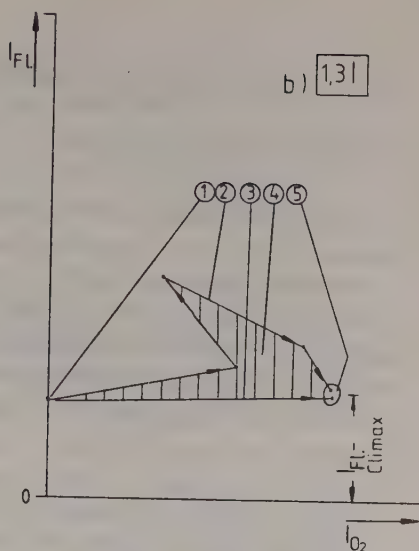
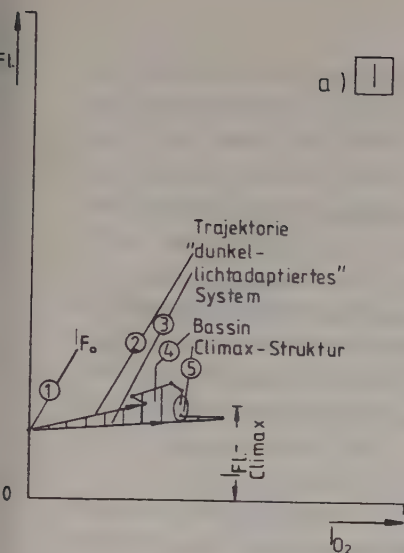
Aus der Theorie (SCHWEGLER 1981) entnehmen wir, daß einer Climax-Struktur eine gewisse Stabilität zugeschrieben werden kann und daß deren Größe durch das Bassin vorgegeben ist. Um aber entscheiden zu können, ob ein bestimmtes vorliegendes Bassin groß oder klein ist, bedarf es des Vergleiches mit anderen Bassins. Es muß also überprüft werden, ob für die unter Betrachtung stehenden Variablen noch andere Bassingrößen aufgezeigt werden können. Zu diesem Zweck ist es erforderlich, das System verschiedenen Werten der Milieuparameter auszusetzen.

Den Chloroplasten betreffend stellen wir uns deshalb die Werteentwicklung der Variablen für zwei weitere Lichtintensitäten vor (Abb. 20 a, a', b, b'; I und 1,3 I). Es wurden solche Intensitäten gewählt, die für das System die Bedeutung nachlassender Sättigung und nichtsättigender Lichtbedingungen haben (siehe auch 4.2.3, S. 48). Aus Abb. 21 a, b ist abzulesen, daß eine geringe Lichtintensität mit einer geringen Bassingröße korreliert. Bei sehr geringen Intensitäten sind die Trajektorien des dunkel- und lichtadaptierten Zustandes nahezu identisch

(Abb. 21 a). Für beide Fälle lassen sich nach wie vor Climax-Strukturen identifizieren. Aufgrund dieser Überlegungen kommen wir zu dem Schluß, daß die Stabilität der Climax-Struktur bei sättigenden Lichtbedingungen vergleichsweise größer ist als bei nichtsättigenden.

Abschließend soll auch der Fall sehr hoher, schädigender Lichtintensitäten geprüft werden. Wir haben eine entsprechende Werteentwicklung in Abb. 20 a, a', b, b' unter $>300 \text{ I}$ eingetragen.

Die Trajektorien des dunkel- und lichtadaptierten Zustandes kehren in beiden Fällen auf die Achse der Fluoreszenzintensität zurück (Abb. 21 d), was gleichbedeutend ist mit einem Aussetzen der O_2 -Produktion. Beide Trajektorien wandern sodann auf der I_{Fl} -Achse dem Nullpunkt entgegen. Weder ein von den Trajektorien gemeinsam umschlossenes Bassin noch eine Climax-Struktur kann erkannt werden. Das Fehlen von Bassin und Climax-Struktur kann aber in diesem Fall als der Hinweis für eine Schädigung des Systems gewertet werden.



0. 21: Die Darstellung des Systemzustandes anhand zweier Zustandsvariablen im Phasendiagramm. Bassingrößen und Climax Struktur für verschiedene Lichtintensitäten, a) - d).
Zustandsvariable: I_{FL} und I_{O_2} ; rel. Lichtintensitäten: 1, 1,3 I, 1,6 I, >300 I.

5.5 Das System im veränderlichen Milieu

5.5.1 Der Strukturtyp

Um etwas zur Stabilität der Climax-Struktur sagen zu können, haben wir Vorstellungen zum Verhalten der Zustandsvariablen für mehrere Werte des Milieuparameters Licht entwickeln müssen. In einem weiteren Schritt interessiert das Variablenverhalten im veränderlichen Milieu. Zu diesem Zweck müssen die den einzelnen Parameterwerten zuzuordnenden Climax-Strukturen zu einer Sequenz aneinandergereiht werden. Setzen wir voraus, daß die Übergänge von einer Climax-Struktur zu einer anderen, innerhalb gewisser Grenzen der Parameterwerte, kontinuierlich erfolgen, dann können wir von einem Strukturtyp sprechen (SCHWEGLER 1981). Sowohl für die Variable O_2 wie auch für Fl. lassen sich Strukturtypen definieren; in Abb. 22 nur für Fl. aufgezeigt.

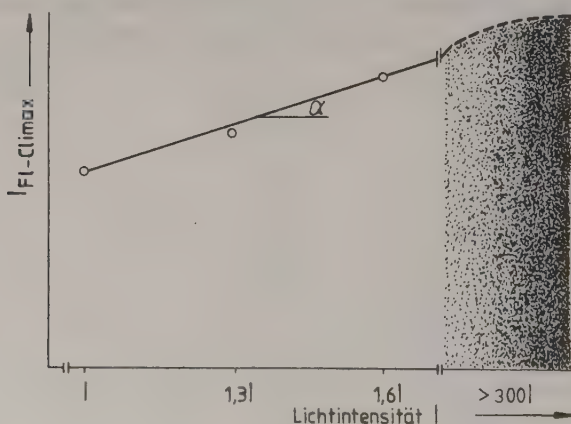


Abb. 22:

Der Strukturtyp der Zustandsvariablen I_{Fl} in Abhängigkeit des Milieuparameters Licht.

α : Winkel, dessen tan die Sensitivität des Strukturtyps angibt; punktierte Fläche: Intensitätsbereich des Lichtes innerhalb dessen die Wahrscheinlichkeit einer Strukturtyp-Instabilität zunimmt.

Aus der Steigung des Graphen läßt sich laut Theorie die Sensitivität des Strukturtyps ermitteln. Auch hier entsteht, wie auch im Falle der Bassinggröße (s.o.) die Schwierigkeit, ohne Vergleichsmöglichkeit nicht entscheiden zu können, ob eine große oder geringe Sensitivität vorliegt.

Zur Erinnerung sei gesagt, daß der lineare Anstieg von $I_{Fl.}$ -Climax auf die Annahme zurückzuführen ist, der Fluoreszenz im steady state eine gleichermaßen lineare Lichtabhängigkeit zuschreiben zu können wie dies für I_{F_0} getan wurde.

In Abb. 22 ist auch die Vorstellung wiedergegeben, was geschieht, wenn die Lichtintensität kontinuierlich erhöht wird. Es ist anzunehmen, daß ein Parameterbereich erreicht wird, innerhalb dessen die Wahrscheinlichkeit einer Strukturtyp-Instabilität zunimmt. Der Grund hierfür kann wohl im Einsetzen einer lichtverursachenden Zerstörung der Pigmente gesehen werden. Bei sehr hoher Intensität ($>300 I$) ist der Graph des Strukturtyps schließlich unterbrochen, da eine Climax-Struktur für diese Intensität nicht mehr nachweisbar ist (siehe Abb. 21 d).

5.5.2 Die Organisation

Als dritte und letzte Ebene seiner Überlegungen nennt SCHWEGLER (1981) die Organisation eines selbsterhaltenden Systems. Die Theorie beschreibt diese als eine Menge von Strukturtypen, welche gegenseitig erreichbar sein können. Was den Chloroplasten betrifft, so haben wir bereits ausgeführt, daß ein Strukturtyp in Hinblick auf den Parameter Licht denkbar ist. Um den Anforderungen einer Orga-

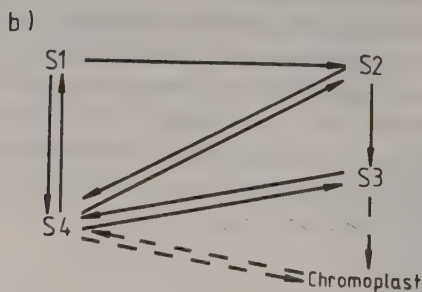
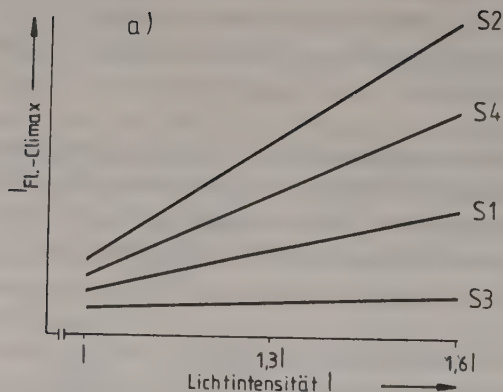


Abb. 23:

Die Ausbildung des Strukturtyps von I_{Fl} , unter dem Aspekt verschiedener Systementwicklungsstadien a) sowie Möglichkeiten des Übergangs zwischen den einzelnen Stadien b). Chloroplastenentwicklungsstadien: S1 = juvenil, S2 = reif, S3 = seneszent, S4 = wiederergrünt; $\longrightarrow$ Übergänge zwischen den Strukturtypen, $\dashrightarrow$ Übergänge mit Strukturtyp-Instabilität.

nisation genügen zu können, müssen plausibel andere Strukturtypen derselben Klasse genannt werden. Die Frage lautet deshalb: Unter welchen Bedingungen kann man sich weitere Strukturtypen bezüglich einer bestimmten Zustandsvariablen, hier Fl., vorstellen? Die Beantwortung der Frage kann man z. B. derart angehen, daß man das System unter dem Aspekt verschiedener ontogenetischer Entwicklungsstadien betrachtet. Wir nehmen an, daß den Entwicklungsstadien juvenil, adult und seneszent unterschiedliche Strukturtypen zugeordnet werden können (Abb. 23 a). Der Sonderfall des Wiederergrünens eines Organismus kann ergänzend hinzugefügt werden (LJUBEŠIĆ 1968, HETHERINGTON et al. 1982).*)

Die Darstellung der Beziehungen zwischen den Strukturtypen erfolgt anhand eines Digraphen (Abb. 23 b). Wir sehen, daß es Übergänge nur in einer Richtung, aber auch solche in mehrere Richtungen geben kann. Manche der Übergänge können mit einer Strukturinstabilität verknüpft sein, wie z. B. der Übergang zum Stadium des Chromoplasten. Dies würde dem entsprechen, was die Theorie als eine Instabilität der Organisation bezeichnet. Ein Verlassen der Organisation liegt dann insofern vor, als daß die Zustandsvariable (Fl.) nicht mehr meßbar ist.

*) Die Steilheit der verschiedenen Strukturtypen ist mehr oder weniger willkürlich gewählt.

5.6 Diskussion

Zu Beginn der Diskussion sollen einige Bemerkungen über die Bedeutung des Begriffes **S t r u k t u r**, wie er in der Theorie von SCHWEGLER (1981) seine Anwendung findet, gemacht werden.

Üblicherweise steht beim Gebrauch dieses Begriffes, und das vor allem im Zusammenhang mit der Beschreibung biologischer Systeme, die Assoziation vom Materiellen im Vordergrund. Genau hier kann aber bei Anwendung der Theorie Anlaß zu Mißverständnissen gegeben sein.

Obzwar die übliche Definition des Strukturbegriffes gemäß Duden als die "Anordnung der Teile des Ganzen zueinander" auch für die Theorie Gültigkeit hat, so muß dort unter Teile doch etwas anderes verstanden werden als z. B. Molekülgruppen, Membranen, Organellen usw. Unter Teile hat man dort Meßwerte zu verstehen, die man erhält, wenn bestimmte Zustandsvariable eines Systems untersucht werden.

Gemäß Theorie kann ein bestimmtes System anhand von Zustandsvariablen beschrieben werden. Dies läßt sich graphisch veranschaulichen, indem die Meßwerte, die man für jede untersuchte Variable ermittelt hat, in ein Schaubild eingetragen werden. Dort läßt sich gegebenenfalls eine spezielle Anordnung der Meßwerte (Teile) zueinander erkennen. Eine derartige Anordnung ist es schließlich, welcher die Theorie, und dies ganz der oben gegebenen Definition entsprechend, die Bezeichnung Struktur verleiht. Bei der Anwendung der Begriffe Climax-Struktur und Struktur-Typ, wie sie in der Theorie vorgeschlagen sind, hat man sich folglich auch nicht eine materiell faßbare Struktur mikro- oder makrokosmischer Größenordnung zu denken. Die Theorie benutzt diese Begriffe vielmehr in der Absicht, spezielle Gruppierungen von Meßwerten der Zustandsvariablen, wie sie

in einem stark vereinfacht darstellbaren Zustandsraum erkennbar sein können, zu charakterisieren.

Es konnte gezeigt werden, daß eine Anwendung der Theorie von SCHWEGLER (1981), mit dem Ziel, Modellvorstellungen zum System Chloroplast zu entwickeln, durchaus möglich ist. Die Überlegungen, die hierzu notwendig waren, befaßten sich mit Fragen zur Struktur und Organisation von Systemzuständen im Sinne der eingangs angeführten Bemerkungen zur Bedeutung des Begriffes Struktur.

Wichtig für die Entwicklung der Modellvorstellungen ist ein Modellansatz, in dem z. B. wesentliche Zustandsvariablen genannt werden. Im Gedankenexperiment bedienen wir uns der Zustandsvariablen Chloroplastenfluoreszenz und O_2 -Entwicklung. Beide Variablen entsprechen den Anforderungen und haben sich darüber hinaus aus vielerlei Gründen als geeignet erwiesen.

Gleichermaßen von Bedeutung ist die Wertezuweisung an die Variablen. Bei diesem Schritt mußten wir uns vielfach theoretischer Daten bedienen. Dies geschah jedoch nicht ohne vorangegangene Überlegungen zu deren Plausibilität. So sind wir für die theoretische Annahme eines steady state in der Sauerstoffentwicklung von folgenden Überlegungen ausgegangen: Es ist erwiesen, daß die Aktivität des wasserspaltenden Komplexes u. a. von der photochemischen Aktivität der Reaktionszentren des PS 2 und der Effektivität des Elektronentransportes zwischen dem PS 1 und PS 2 abhängig ist. Diese Abhängigkeit findet letztlich ihren Ausdruck im Vorhandensein einer Induktion der Sauerstoffentwicklung. Die Erklärung der synchron entstehenden Fluoreszenzinduktion kann unter Zuhilfenahme genau derselben Ursachen vorgenommen werden. Es ist nur konsequent anzunehmen, daß das synchrone Verhalten der beiden Variablen, was deren Werteentwicklung anbelangt, auch bei Erreichen eines Photosynthesegleichgewichtes seine Richtigkeit besitzt.

Für die Chloroplastenfluoreszenz ist der steady state etwas Erwiesenes, so daß es nur konsequent ist, selbiges für die Sauerstoffentwicklung zu postulieren.

Bei einer anderen theoretischen Annahme wurde aus der empirisch ermittelten Proportionalität der Grundfluoreszenz zur Lichtintensität auf eine ebensolche Abhängigkeit der Fluoreszenz im steady state geschlossen. Dieser Schluß ist insofern plausibel, als idealerweise angenommen werden kann, daß unter Gleichgewichtsbedingungen der gesamte Pool der Komponenten des Elektronentransportes erneut den Zustand erreicht hat, welcher bis zum Einsetzen der variablen Fluoreszenz charakteristisch für die Komponenten war.

Ein zentraler Punkt der Theorie ist das Postulat von der Existenz von Climax-Strukturen bei selbsterhaltenden biologischen Systemen. Im Zusammenhang mit der Modellbildung steht deshalb an erster Stelle die Frage nach den Bedingungen, die erfüllt sein müssen, damit solche Gleichgewichtssituationen erkannt werden können.

Die Beurteilung, ob eine Climax-Struktur vorliegt oder nicht, ist im vorliegenden Fall graphisch mit Hilfe eines Phasendiagramms erfolgt. Es werden dort die Werte der einzelnen Variablen gegeneinander aufgetragen. Dies ist aber nur dann sinnvoll, wenn folgende Punkte vorher Beachtung finden:

- a) Die Werteentwicklung der untersuchten Variablen muß in einen steady state münden und während eines angemessenen Zeitraumes stabil sein.
- b) Eine Korrelation hat nur unter solchen Variablen zu erfolgen, bei denen eine enge kausale Beziehung erkennbar ist.
- c) Es ist darauf zu achten, daß der Zeitbedarf bis zur Entstehung eines steady state bei den zur Untersuchung

herangezogenen Variablen weitgehend identisch ist.

Allen drei Punkten wird gleiche Bedeutung beigemessen. Es wäre wenig hilfreich, wenn zwar die Forderung eines steady state erfüllt wäre (Punkt a), die Dauer bis zum Eintritt desselben bei den korrelierten Variablen aber weit auseinanderläge (Punkt c).

Eine Climax-Struktur ist durch eine gewisse Stabilität ausgezeichnet. Diese wird durch das Vorhandensein eines Einzugsbereiches, dem Bassin, bestimmt, aus dem sämtliche Trajektorien in die Climax-Struktur hineinmünden.

In der vorliegenden Modellbetrachtung werden die ungefähren Grenzen des Bassins durch den Verlauf der Trajektorien aus den gegensätzlichen Systemzuständen licht- und dunkeladaptiert gebildet. Es ist deshalb die Rede von ungefähren Bassingrenzen, da Fluktuationen des Trajektorienverlaufes ohne Berücksichtigung bleiben.

Aus den Überlegungen zum Verhalten des Systems bei Änderung der Milieubedingungen geht hervor, daß für dieselben Zustandsvariablen mehrere Climax-Strukturen definiert werden können. Darüber hinaus wurde deutlich, daß es sich um Climax-Strukturen mit unterschiedlichen Bassingrößen handelt, die folglich auch unterschiedliche Stabilitäten aufweisen. Offensichtlich ist die Bassingröße, innerhalb gewisser Grenzen, von der Intensität des Milieuparameters, hier des Lichtes, abhängig. Die Einschränkung hat für den Fall schädigender Intensitäten Gültigkeit, wo allerdings weder Climax-Struktur noch Bassin definierbar sind. Den Ergebnissen der Gedankenexperimente ist auch zu entnehmen, daß die größte Climax-Stabilität bei lichtsättigenden Bedingungen vorliegt. Es ist insofern verständlich, aus der Bassingröße auf die Stabilität der Climax-Struktur schließen zu wollen, als bei großem Bassin eine vergleichsweise

größere Möglichkeit zur Bildung einer Climax-Struktur gegeben ist als bei kleinem Bassin.

Die Überlegungen, daß bei einer Veränderung der Lichtintensität mehrere Climax-Strukturen, gewissermaßen derselben Klasse, entstehen können, führt zu dem Schluß, daß ein S t r u k t u r t y p definierbar ist. Man hat sich zu diesem Zweck lediglich die verschiedenen Climax-Strukturen in Abhängigkeit der Lichtintensität zu einer Serie zusammengesetzt zu denken. Im vorliegenden Fall wurden aus Gründen der Vereinfachung nur die Climax-Intensitäten der Fluoreszenz gegen die Lichtintensität aufgetragen; man hätte dies gleichermaßen für die Sauerstoffentwicklung tun können.

Es ist auf die Annahmen im Modellansatz zurückzuführen, daß im aufgezeigten Beispiel keine Aussagen zur Sensitivität des Strukturtyps gemacht werden können. Zu diesem Zweck hätte der Graph des Strukturtyps ein nichtlineares Verhalten aufweisen müssen. Erst dann ist es möglich, zu entscheiden, bei welcher Lichtintensität die größte Sensivität des Strukturtyps vorliegt.

Was die Stabilität des Strukturtyps anbelangt, so wird diese durch die Bassingröße der jeweiligen Climax-Struktur vorgegeben. Das bedeutet aber, daß der Strukturtyp durch Bereiche ganz unterschiedlicher Stabilität ausgezeichnet sein kann. Vergewegenwärtigen wir uns erneut die Bassingrößen der verschiedenen aufgezeigten Climax-Strukturen, dann stellt sich heraus, daß die Stabilität des Strukturtyps mit steigender Lichtintensität zunimmt. Bei sehr hoher Intensität liegt dahingegen abrupt eine Instabilität vor, es ist durchaus denkbar, daß diese auch schon bei geringeren Intensitäten einsetzt. Es bleibt dem Versuch vorbehalten, zu klären, ob ein Bereich der Lichtintensi-

tät definiert werden kann, innerhalb dessen die Stabilität stetig geringer wird oder ob tatsächlich der Zustand der Instabilität schlagartig einsetzt.

Um eine Vorstellung davon zu bekommen, was im Zusammenhang mit dem Chloroplasten eine Organisation sein könnte, haben wir ein Beispiel konstruiert. Wir sind zu diesem Zweck von der Annahme ausgegangen, daß für jedes ontogenetische Entwicklungsstadium ein anderer Strukturtyp von I_{Fl} -Climax vorliegen kann. Dies ist plausibel, wenn man bedenkt, daß jedes Entwicklungsstadium durch unterschiedliche Chlorophyllkonzentrationen gekennzeichnet ist. Es steht weiterhin außer Zweifel, daß sich die einzelnen Stadien zumindest in einer Richtung erreichen können. Denkbar sind aber auch reversible Übergänge, wo z. B. aus einem Seneszenz-Stadium ein Stadium des Wiederergrünnens hervorgeht und umgekehrt.

Weiterhin sind auch Übergänge denkbar, denen eine Instabilität des Strukturtyps zugrundeliegt. Es sei auf den Übergang vom Stadium der Seneszenz zum Stadium des Chromoplasten verwiesen. Eine Instabilität des Strukturtyps kann hier deshalb vermutet werden, da für einen Chromoplasten eine Fluoreszenz, wie sie für den Chloroplasten charakteristisch ist, nicht nachgewiesen werden kann. Dies ist auch ein Beispiel für eine Veränderung des Strukturtyps, im Verlauf derer die eine Organisation (Chloroplast) verlassen wird und ein Übergang in eine andere (Chromoplast) erfolgt (KREEB et al. 1981). Gemäß des Sprachgebrauches der Theorie (SCHWEGLER 1981) ist dies eine sogenannte Instabilität der Organisation.

6. SYNOPSIS

Aus Vorversuchen wurde ersichtlich, daß eine unterschiedliche Dauer einer Fluoreszenzanregung unterschiedliche Formen der Induktionskurve zu erzeugen vermag. Die verschiedenen Kurvenformen wurden entsprechend der Dauer des anregenden Lichtimpulses in eine sehr schnelle, schnelle und langsame Induktion typisiert. Jeder Kurventyp birgt in Richtung langsame Induktion neue Information über die Vorgänge in der Photosynthesemembran.

Aus einer sehr schnellen Induktion sind Informationen vornehmlich photophysikalischer und photochemischer Art erhältlich. Eine schnelle Induktion erweitert den Blick auf die Vorgänge des Elektronentransportes zwischen den Photosystemen. Die langsame Induktion reflektiert schließlich auch biochemische Prozesse. In einer langsamen Induktion sind folglich drei verschiedene funktionale Bereiche der Photosynthese in einem Kurvenzug verknüpft. Bedauerlicherweise wird mit zunehmender Dauer der Induktion deren Informationswert immer geringer. Dies rührt letztlich daher, daß die Chloroplastenfluoreszenz von einer Vielzahl, an den Photosyntheseabläufen beteiligter Prozesse, gesteuert werden kann. Anders ausgedrückt, die langsame Induktion ist ein von einer Vielzahl von Vorgängen überlagertes Signal.

Die für die Moose ermittelten Induktionskurven haben eine große Ähnlichkeit mit solchen, wie sie für Grünalgen und höhere Pflanzen in der Literatur bereits vorliegen (vergleiche z. B. MUNDAY JR. und GOVINDJEE 1969 oder SCHREIBER et al. 1977). Der gelegentlich zu beobachtende unterschiedliche Zeitbedarf bis zum Erreichen des Fluoreszenzmaximums ist wohl in den meisten Fällen auf Unterschiede in der Intensität des anregenden Lichtes zurückzuführen (siehe 4.2.3, S. 48).

Bei den untersuchten Moosarten waren keine Unterschiede im Zeitbedarf bis zur Entstehung der einzelnen Induktionsmerkmale festzustellen, vorausgesetzt, es wurde immer mit gleicher Lichtintensität angeregt. Unterschiede gab es allerdings, was die Fluoreszenzintensität der einzelnen Merkmale anbelangte. Dies dürfte aber generell auf unterschiedliche Chlorophyllkonzentrationen in den einzelnen Proben zurückzuführen sein. Wir schließen hieraus, daß zwischen den einzelnen Moosarten zwar Unterschiede die Chlorophyllkonzentration betreffend erwartet werden können, nicht jedoch, was deren Organisation des Photosyntheseapparates anbelangt. Abweichende Chlorophyllkonzentrationen sind jedoch auch innerhalb einer Art, aber unterschiedlicher Insertion, zu erkennen. Dies kann Ursache für starke Streuungen der Meßwerte sein. Eine standardisierte Probenentnahme war deshalb unerlässlich.

Mit dem Ziel einer Standardisierung wurden einige Randgrößen untersucht, welche speziell für die Fluoreszenzinduktion von Bedeutung sein können.

Die in der Mikroskopie übliche Praktik, ein auf dem Objektträger befindliches Präparat mit einem Deckgläschen abzudecken, darf für einschichtige Moosblätter nicht angewandt werden. Andernfalls zeigt die Fluoreszenzinduktion Effekte, welche nach Vergleich mit Literaturwerten als O_2 -Mangelsymptome einzuschätzen sind. Die Ursache dieses Sauerstoffmangels wird in der Tatsache gesehen, daß aufgrund der Einschichtigkeit der Moosblätter bei Abdeckung die Grenzflächen zur Luft drastisch reduziert werden. Ein Indiz für die Richtigkeit der Annahme, es liege ein Sauerstoffmangel vor, ist die Tatsache, daß sämtliche Effekte im Licht voll reversibel sind. Wir stellen daher fest: Die Induktionskurve reagiert sehr empfindlich auf Sauerstoff-

mangel. Die dadurch verursachten Effekte sind im Licht voll reversibel.

Die Ausbildung der charakteristischen Induktionsmerkmale gelingt nur innerhalb gewisser Grenzen der Lichtintensität. Es hat sich gezeigt, daß bei geringen Lichtintensitäten lediglich die Grundfluoreszenz entsteht. Deren Intensität ist proportional zur Lichtintensität. Mit steigender Lichtintensität entsteht auch eine variable Fluoreszenz, deren Induktionsmerkmale bei hohen Lichtintensitäten wieder verloren gehen. Wir deuten diese Ergebnisse derart, daß bei geringen Lichtintensitäten alleine die Effektivität des Excitonentransportes im Pigmentsystem für die Fluoreszenz ausschlaggebend ist. Mit steigender Photonenflußdichte entstehen Engpässe im Elektronentransportsystem, so daß es vorübergehend zu einem Excitonenzustau in der Antenne des PS 2 und den LHCP-Komplexen kommt. Bei exzessiven Intensitäten kann die Elektronentransportkette wegen Überlastung nicht mehr wirksam werden; darüber hinaus setzt eine lichtbedingte Zerstörung der Pigmente ein.

Je nach Zustand des Photosystems bezüglich Dunkel- oder Lichtadaption ergibt eine Fluoreszenzanregung unterschiedlich starke Ausprägungen der Induktionsmerkmale. Zur Überführung des Systems von einem Zustand in den anderen bedarf es einer gewissen Zeit. Ihre Vorgabe erfolgt durch das jeweilige Ausgangsstadium des Systems. Anhand der zu diesem Problem durchgeführten Versuche wurde deutlich, daß die Steuerung der Fluoreszenzinduktion nicht alleine von photochemischen Vorgängen und solchen des Elektronentransportes abhängig ist, sondern auch von biochemischen mit langen Reaktionszeiten.

Unsere Ergebnisse sind aufgrund des verwendeten Meßprogrammes so zu deuten, daß die Zustandsübergänge von licht- in dunkeladaptiert und umgekehrt identisch sind mit den sogenannten state 2 - state 1-Transformationen. Als Ursache für solche Zustandsänderungen wird in neuerer Zeit eine plastoquinongesteuerte LHCP-Phosphorylierung genannt. Es liegt die Vermutung nahe, daß ein solcher Vorgang auch in Mooschloroplasten stattfinden kann und der Grund für die langen Zeiten bis zum Erreichen eines bestimmten Zustandes ist.

State 1 - state 2-Übergänge können mit Hilfe von langwelligem Rotlicht (PS 1 Licht) eingeleitet werden. In unseren Versuchen haben wir dieselbe Wirkung mit Dunkelphasen erzielt.

Eine stark reduzierte variable Fluoreszenz, dies wird hier deutlich, ist nicht grundsätzlich mit irgendwelchen Schädigungen der Funktionen der Photosynthesemembran gleichzusetzen. Es ist im Gegenteil, hier die starke Löschung von F_v als der Ausdruck einer verbesserten Nutzung der eingestrahltten Lichtenergie zu werten. Die Maßgabe, durch Dunkeladaptation eine vollständige Induktionskurve vorzubereiten, bedeutet folglich nichts anderes, als das System in einen Zustand der minderen Energienutzung überführen zu wollen.

Temperaturbedingte Veränderungen der Fluoreszenzinduktion sind bei Raumtemperatur nicht zu erwarten; dies haben diesbezügliche Versuche gezeigt. Umso tiefgreifender aber sind die Veränderungen bei tiefen und hohen Temperaturen.

Die Wirkung von Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt scheint spezifisch zu sein und zeigt eine Ähnlichkeit mit der Wirkung von DCMU. Tatsächlich wird für beide fluoreszenzverändernde Ursachen eine Hemmwirkung auf der reduzierenden Seite des RZ 2 angenommen.

Hohe Temperaturen verursachen funktionale und strukturelle Störungen in der Photosynthesemembran. ARMOND et al. (1980) konnten den Zusammenhang zwischen hoher Temperatur und funktionaler Trennung der Pigmentsysteme nachweisen. Die in diesem Zusammenhang gewonnenen Fluoreszenzdaten werden dadurch interpretierbar. Es war zu beobachten, daß die hohe temperaturbedingte Effektbildung Ähnlichkeiten mit solchen von Quinonverbindungen haben. Die Aktivität dieser Verbindungen scheint mit ihrer Funktion als Fluoreszenzquencher in unmittelbarer RZ 2-Nähe erklärt werden zu können (PFISTER 1977). Sicherlich ist es nicht möglich, hohen Temperaturen die Bildung von Substanzen mit einer solchen Wirkung zuschreiben zu wollen. Die Tatsache der temperaturbedingten funktionalen Trennung der lichtabsorbierenden Membrankomponenten führt jedoch zur Annahme, daß ein hoher Anteil an Lichtenergie bereits in den Pigmentkomplexen deaktiviert wird. Den restlichen, erfolgreich zu den Reaktionszentren gelangenden Excitonen, würde nun ein vergleichsweise größerer Pool an Reaktionszentren zur Verfügung stehen. Ein weites Verhältnis von Reaktionszentren zur Excitonendichte wird aber immer auch eine schwache Ausbildung der variablen Fluoreszenz zur Konsequenz haben.

Die Untersuchungen zum Entwicklungszustand der Moosblätter haben verdeutlicht, daß es sich dabei um einen Faktor handelt, der die Fluoreszenzinduktion stark beeinflussen kann. Zwischen der rein visuellen Klassifikation der Moosblätter in die ontogenetischen Stadien juvenil, adult und seneszent und den zu den einzelnen Stadien gehörenden Fluoreszenzwerten gibt es eine positive Beziehung. Das heißt, die Fluoreszenzintensität nimmt mit fortschreitender Entwicklung bis zum Stadium

der Reife zu. Andererseits aber lassen sich beim Vergleich der Induktionskurven von jungen und reifen Blättern hinsichtlich der Kurvenkinetik keinerlei Unterschiede erkennen. Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß auch in den jungen Blättern - sie sind mit kaum 1 mm^2 im Schnitt 10 mal kleiner als reife Blätter - bereits ein vollentwickeltes Photosystem angelegt ist. In seneszenten Blättern äußern sich die einsetzenden Abbauerscheinungen durch eine veränderte Kurvenkinetik und ein Nachlassen der Fluoreszenzintensität.

Unter kontrollierten Bedingungen wurde die Wirkung einer SO_2 -Begasung auf die Fluoreszenzinduktion untersucht. Der Modellversuch entsprach, die Aufnahme des SO_2 -Gases betreffend, weitgehend den natürlichen Gegebenheiten (Lösung des Gases in Wasser, Transport der SO_2 -Produkte im wässrigen Milieu durch die Zellen).

Unseres Wissens zufolge gibt es nur sehr wenige SO_2 -Begasungsversuche, in denen die Fluoreszenzinduktion als Indikatorsignal verwendet wurde (ARNDT 1974, SHIMAZAKI und SUGAHARA 1980, SCHIELE et al. 1981). Die Ergebnisse des Modellversuches können deshalb als ein Beitrag zur Kenntnis der SO_2 -Phytotoxizität angesehen werden.

Bei geringen Konzentrationen kann die Begasungswirkung als spezifisch bezeichnet werden. Es liegen rein funktionale Störungen vor, die sich über eine Veränderung der variablen Fluoreszenz zu erkennen geben. Bei hohen Konzentrationen ist eine breite Wirkung mit oxidativen Charakter (HEATH 1980) zu beobachten. Die Abnahme von Grundfluoreszenz und variabler Fluoreszenz gleichzeitig signalisiert den Abbau des Chlorophylls. Wahrscheinlich ist in diesem Stadium nicht SO_2 das eigentlich schädlich wirkende Agens, sondern sekundär gebildete reaktive Sauerstoffradikale (RABINOWITCH und FRIDOVICH 1983). Eine bei geringer SO_2 -Konzentration zu erwartende Nährstoffwirkung konnte nicht festgestellt werden (FALLER 1968). Es wäre aber interessant, einmal der Frage nachzugehen, wie sich dies in der Fluoreszenzinduktion niederschlagen hätte.

Die Ergebnisdarstellung in Form von Konzentrations-Zeit-Kurven macht deutlich, daß die Schadwirkung u. a. von der Kombination aus SO_2 -Konzentration und Wirkdauer abhängig ist. Es ist nämlich zu erkennen, daß die Effektausbildung bei geringen Konzentrationen, jedoch langfristig appliziert, weitaus geringer ist als im Falle der kurzfristigen Anwendung hoher Konzentrationen. Hiermit wird bestätigt, was bereits bekannt und beschrieben wurde (vergleiche z. B. VAN HAUT und STRATMANN 1969 sowie GUDERIAN und VAN HAUT 1970).

Die beiden untersuchten Moosarten zeigten grundsätzlich identische Effekte im Induktionskurvenzug. Abweichungen konnten nur hinsichtlich des Zeitpunktes des Eintretens eines bestimmten Effektes beobachtet werden. Setzt man voraus, daß eine vergleichsweise verzögerte Effektausbildung als Resistenzzeichen anzusehen ist, dann hätte sich *Mnium hornum* in unserem Versuch als geringfügig widerstandsfähiger erwiesen.

Zusätzlich zur Fluoreszenzanregung hinzukommende mikroskopische Beobachtungen von begasten Proben haben ergeben, daß die Induktionskurve bereits starke Schäden anzuzeigen vermag, wo noch keinerlei visuelle Bestätigung derselben erkennbar ist. Dies ist ein Punkt, der vor allem bedeutsam ist bei der Früherkennung von Schadstoffwirkungen.

Die Induktionskurve ist ein sensibler Indikator zur Kennzeichnung von Veränderungen in der Photosynthesemembran.

Es werden Veränderungen sowohl funktioneller als auch struktureller Art angezeigt. Die Chloroplastenfluoreszenz ist deshalb bestens für bioindikative Zwecke geeignet.

Dies ist sowohl durch die Untersuchung der Wirkung von Randgrößen als auch den modellartig durchgeführten Be-
gasungsversuch belegt worden.

Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse macht aber auch deutlich, daß es sich bei der Chloroplastenfluoreszenz nicht

um ein Meßsignal handelt, mit dessen Hilfe ein bestimmter Wirkstoff oder spezielle Einflüsse physikalischer Natur identifiziert werden können; denn die Effektausbildung ist, was die untersuchten Randgrößen und die Begasung anbelangt, keineswegs spezifisch. Es ist aber durchaus, wenn auch in Grenzen, möglich, über die Chloroplastenfluoreszenz den Ort einer Wirkung festzulegen.

Folgende Schlüsse lassen sich aus dem Gesagten ableiten:

- Der Photosyntheseapparat der untersuchten Moose ist nicht prinzipiell verschieden von jenem der Grünalgen oder höheren Pflanzen.
- Da bei den untersuchten Moosen keine arttypische Induktionskurve beobachtet werden konnte, ist anzunehmen, daß dies auch für andere Moosarten zutrifft.
- Durch Kammereffekte kann unbeabsichtigterweise eine Anaerobiose erzeugt werden, deren Wirkung an der Induktionskurve abzulesen ist.
- Eine vollständige Induktionskurve entsteht nur bei sättigender Lichtintensität. Die vollständige Induktionskurve ist deshalb der Ausdruck eines lichtgesättigten Systemzustandes. Das System ist bestrebt, einen steady state einzunehmen.
- In Mooschloroplasten finden state 1-state 2-Übergänge statt.
- SO_2 in geringen Konzentrationen nimmt primär Einfluß auf funktionale Abläufe der Photosynthese. SO_2 in hohen Konzentrationen wirkt strukturzerstörend.

Zur Beschreibung des Chloroplasten nach systemtheoretischen Gesichtspunkten bedienen wir uns der Theorie von SCHWEGLER (1981). Die Grundgedanken der Theorie sind kurz umrissen folgende: a) Eine Systembeschreibung kann mit Hilfe von Zustandsvariablen und Milieuparametern erfolgen und b) in einer quasi konstanten Umgebung läßt sich für ein selbsterhaltendes System zumindest ein Gleichgewichtszustand finden. Diese Gleichgewichtssituation wird als Climax-Struktur bezeichnet.

Was den Chloroplasten anbelangt, so konnten zwei Zustandsvariablen benannt werden, für die eine Climax-Struktur definierbar ist.

Unter veränderlichen Umgebungsbedingungen verändern sich auch die Gleichgewichtszustände, so daß sich gegebenenfalls eine Sequenz von Climax-Strukturen abzeichnet. Dies führt zu einer neuen Betrachtungsebene, der Ebene des Strukturtyps. Eine dritte und letzte Ebene wird durch die Möglichkeit definiert, daß mehrere Sequenzen von Climax-Strukturen entweder nur in eine Richtung oder aber auch reversibel ineinander übergehen können.

Aufgrund der Annahmen den Chloroplasten betreffend konnten auf der Ebene der Climax-Struktur aufbauend auch die des Strukturtyps und der Organisation konstruiert werden. Das Bild, das dabei entsteht, stellt ein abstraktes Modell zur parameterabhängigen Zustandssituation des Chloroplasten dar.

Gemäß der Hierarchie der Zustandssituationen können Aussagen zu deren Stabilität gemacht werden. Was das Chloroplasten-Modell anbelangt, so gründet die Stabilität des Strukturtyps auf jener der Climax-Strukturen, aus denen er besteht. Die Stabilität der Climax-Struktur ist dahingegen durch die Menge der Werte, welche den beiden Zustandsvariablen (F_1, O_2) zu-

geordnet werden können, bestimmt.

Was die Stabilität der Organisation anbelangt, so konnte zwar eine Situation genannt werden, in der die Organisation verlassen wird (Instabilität der Organisation), die Annahmen zum Modellansatz reichten jedoch nicht aus, um eine weitere Charakterisierung vornehmen zu können.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Das Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, inwieweit die Chloroplastenfluoreszenz zu bioindikativen Zwecken geeignet ist. Des weiteren interessierte die Anwendung einer Theorie von SCHWEGLER (1981) auf das Zellorganell Chloroplast.

Einleitend beginnt die Arbeit mit einer Darstellung der Grundlagen zur Chloroplastenfluoreszenz wie sie aus heutiger Sicht gegeben sind.

Als pflanzliches Untersuchungsobjekt dienten einschichtige Moose der Gattung *Mnium*. Zwecks Einschränkung der biologischen Variabilität wurden die Moose im Labor kultiviert. Die Wahl der Pflanzen, mit dem Ziel die Chloroplastenfluoreszenz auf mikroskopischen Wege zu untersuchen, entsprach einer optimalen Anpassung von Untersuchungsobjekt und apparativen Gegebenheiten.

Aus Vorversuchen ging hervor, daß die untersuchten Moose Induktionskurven zeigten, welche sich nicht wesentlich von jenen unterschieden, wie sie für ganz unterschiedliche Pflanzenarten in der Literatur bereits beschrieben wurden. Dadurch war nicht nur eine rein phänomenologische Beschreibung, sondern auch eine funktionale Interpretation der Induktionskurven möglich.

Die Untersuchung der Wirkung von Randgrößen erbrachte folgende Erkenntnisse:

- a) Die Induktionskurve zeigte starke Veränderungen bei O_2 -Mangel. Dieser entsteht, wenn das Moosblatt während einer längeren Dunkelphase in einer zu eng bemessenen Kammer aufbewahrt wird.
- b) Eine vollständige Induktionskurve entsteht nur, wenn der Photosyntheseapparat mit sättigender Lichtintensität bestrahlt wird. Zu geringe Lichtintensitäten erzeugen lediglich eine Grundfluoreszenz, zu hohe Intensitäten verursachen dahingegen Schäden.
- c) Für eine vollständige Induktionskurve ist eine längere Dunkelphase notwendig. Die Ursache der langsamen Regeneration der Induktion wird mit einem state 2-state 1-Übergang in Verbindung gebracht.
- d) Bei Raumtemperatur konnten keinerlei diesen Faktor betreffende Effekte erkannt werden, wohl jedoch bei hoher und tiefer Temperatur. Bei ersterer kann durch die Fluoreszenz eine Strukturzerstörung induziert werden, bei letzterer lassen sich dahingegen eher spezifische und DCMU-ähnliche Effekte nachweisen.
- e) Die Induktionskurve ist auch vom jeweiligen Entwicklungszustand des Probenmaterials abhängig. Als juvenil und reif eingestufte Moosblätter unterscheiden sich lediglich hinsichtlich der Intensität der Kurve, seneszente hingegen auch die Induktionskinetik betreffend.

SO₂-Begasungsversuche im Labor haben eine empfindliche Reaktion der Chloroplastenfluoreszenz bei einer solchen Einflußnahme erkennen lassen. Es wurde festgestellt, daß bei geringen SO₂-Konzentrationen eher eine spezifische, bei hohen Konzentrationen hingegen eine unspezifische Wirkung vorliegt. Versuche mit unterschiedlicher Kombination von Konzentration und Zeit zeigten, daß die Schädigung im Falle geringer Konzentrationen, langfristig appliziert viel geringer ist als im Falle hoher Konzentration, kurze Zeite angewandt.

Mit Hilfe der Chloroplastenfluoreszenz ist es möglich, lange vor Sichtbarwerden von Schäden eine Begasungswirkung nachzuweisen.

Beide Moosarten zeigten prinzipiell dieselbe Begasungswirkung. Eine gewisse zeitliche Verzögerung die Reaktion betreffend wurde als Resistenzzeichen gewertet.

Sowohl anhand der Untersuchung von Randgrößen als auch der SO₂-Begasungswirkung konnte gezeigt werden, daß die Chloroplastenfluoreszenz in jeder Hinsicht zu bioindikativen Zwecken geeignet ist.

Abschließend wurde der Versuch unternommen, den Chloroplasten nach systemtheoretischen Gesichtspunkten zu beschreiben. Aus diesem Unterfangen entstanden Modellvorstellungen, mit Hilfe derer es möglich war, a) bestimmte Systemeigenschaften als strukturiert und organisiert zu erkennen und b) Aussagen zu deren milieuabhängigen Stabilität bzw. Instabilität machen zu können.

8. LITERATUR

- AKOYUNOGLU, G. (1977): Development of the photosystem 2 unit in plastids of bean leaves greened in periodic light. Arch. Biochem. Biophys. 183, 571 - 580.
- ALLEN, J. F., BENNETT, J., STEINBACK, K. E., ARNTZEN, C. J. (1981): Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. Nature (London) 291, 21 - 25.
- AMESZ, J. (1977): Plastoquinone. In: Encycl. Plant Physiol., Vol. 5 (eds. Trebst, A. and Avron, M.), 238 - 246, Berlin.
- ANDERSON, J. M. (1980): Chlorophyll-protein complexes of higher plant thylakoids: Distribution stoichiometry and organization in the photosynthetic unit. FEBS Lett. 117, 327 - 331.
- ANDERSON, J. M. and ANDERSSON, B. (1982): The architecture of photosynthetic membranes: Lateral and transverse organization. Trends Biochem. Sci. 7, 288 - 292.
- ANDERSSON, B. and ANDERSON, J. M. (1980): Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 593, 427 - 440.
- AOKI, M. and KATOH, S. (1982): Oxidation and reduction of plastoquinone by photosynthetic and respiratory electron transport in a cyanobacterium Synechococcus sp. Biochim. Biophys. Acta 682, 307 - 314.
- ARENZ, H. (1970): Chlorophyllfluoreszenz und photochemische Primärprozesse in lebenden Pflanzen und Chloroplastensuspensionen (Untersuchungen zum Kautsky-Effekt). Dissertation TH Aachen.
- ARMOND, P. A., BJÖRKMAN, O. and STAEHELIN, L. A. (1980): Dissociation of supramolecular complexes in chloroplast membranes. A manifestation of heat damage to the photosynthetic apparatus. Biochim. Biophys. Acta 601, 433 - 442.
- ARMOND, P. A., SCHREIBER, U. and BJÖRKMAN, O. (1978): Photosynthetic acclimation to temperature in the desert shrub, *Larrea divaricata*. II. Light-harvesting efficiency and electron transport. Plant Physiol. 61, 411 - 415.

ARNDT, U. (1971): Konzentrationsänderungen bei Blattfarbstoffen unter dem Einfluß von Luftverunreinigungen. Ein Diskussionsbeitrag zur Pigmentanalyse. Environ. Pollut. 2, 37 - 48.

- (1972): The Kautsky-effect as a sensitive proof for air pollution effects on plants. Chemosphere 5, 187 - 190.
- (1974): The Kautsky-effect: A method for the investigation of the actions of air pollutants in chloroplasts. Environ. Pollut. 6, 181 - 193.

ARNOLD, H. und KREEB, K. H. (1976): Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Immissionsschäden an Flechten. Angew. Bot. 50, 209 - 216.

ARNTZEN, C. J. (1978): Dynamic structural features of chloroplast lamellae. In: Current topics in bioenergetics, Vol. 8 (eds. Rao Sanadi, D., Vernon, L. P.), 111 - 160, New York.

BAKER, N. R. and BRADBURY, M. (1981): Possible applications of chlorophyll fluorescence technics for studying photosynthesis in vivo. In: Plants and the day-light spectrum (ed. Smith, H.), 355 - 373, London.

BARBER, J. (1976): Ionic regulation in intact chloroplasts and its effect on primary photosynthetic processes. In: The intact chloroplast, Vol. 1 (ed. Barber, J.), 88 - 134, Amsterdam.

BARBER, J. (1980): Membrane Surface charges and potentials in relation to photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta 594, 253 - 308.

- (1982): Influence of surface charges on thylakoid structure and function. Ann. Rev. Plant Physiol. 33, 261 - 295.
- (1983): Photosynthetic electron transport in relation to thylakoid membrane composition and organization. Plant, Cell and Environment 6, 311 - 322.
- CHOW, W. S., SCOUFFLAIRE, C., LANNOYE, R. (1980): The relationship between thylakoid stacking and salt induced chlorophyll fluorescence changes. Biochim. Biophys. Acta 591, 92 - 103.
- HORLER, D.N. H. and CHAPMAN, D. J. (1981): Photosynthetic pigments and efficiency in relation to the spectral quality of absorbed light. In: Plant and the daylight spectrum (ed. Smith, H.), 341 - 354, London.

- MILLS, J., NICOLSON, J. (1974): Studies with cation specific ionophores show that within the intact chloroplast Mg^{2+} acts as the main exchange cation for H^+ pumping. FEBS Lett. 49, 106 - 110.
- TELFER, A., MILLS, J. and NICOLSON, J. (1974): Slow chlorophyll fluorescence changes in isolated intact chloroplasts evidence for cation control. In: Proc. Int. Congr. Photosynth., 3rd., Vol. 1 (ed. Avron, M.), 3 - 63, Amsterdam.
- BEEKLEY, P. K. and HOFFMAN, G. R. (1981): Effects of sulfur dioxide fumigation on photosynthesis, respiration, and chlorophyll content of selected lichens. The Bryologist 84, 379 - 390.
- BENNETT, J. (1983): Regulation of photosynthesis by reversible phosphorylation of the light-harvesting chlorophyll a/b protein. Biochem. J. 212, 1 - 13.
- STEINBACK, K. E., ARNTZEN, C. J. (1980): Chloroplast phosphoproteins: Regulation of excitation energy transfer by phosphorylation of thylakoid membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5253 - 5257.
- BERRY, J. and BJÖRKMAN, O. (1980): Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 31, 491 - 543.
- BOARDMAN, N. K., ANDERSON, J. M. and GOODCHILD, D. J. (1978): Chlorophyll-protein complexes and structure of mature and developing chloroplasts. Curr. Top. Bioenerg. 8, 35 - 109.
- BONAVENTURA, C. and MYERS, J. (1969): Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa*. Biochim. Biophys. Acta 189, 366 - 389.
- BOWES, J. M. and HORTON, P. (1982): The effect of redox potential on the kinetics of fluorescence induction in photosystem 2 particles from *Phormidium laminosum*. Sigmoidity, energy transfer and the slow phase. Biochim. Biophys. Acta 680, 127 - 133.
- BRADBURY, M. and BAKER, N. R. (1981): Analysis of the slow phases of the in vivo chlorophyll fluorescence induction curve. Changes in the redox state of photosystem 2 electron acceptors and fluorescence emission from photosystem 1 and 2. Biochim. Biophys. Acta. 635, 542 - 551.

- BRIANTAIS, J. M., VERNOTTE, C., PICAUD, M. and KRAUSE, G. (1979): A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 548, 128 - 138.
- BUTLER, W. L. (1966): Fluorescence yield in photosynthetic systems and its relation to electron transport. In: *Current topics in bioenergetics*, Vol. 1 (ed. Sanadi, D. R.), 49 - 73, New York.
- (1977): Chlorophyll fluorescence: A probe for electron transfer and energy transfer. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. 5 (eds. Trebst, A. and Avron, M.), 149 - 166, Berlin.
 - (1978): Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29, 345 - 378.
 - (1979): Tripartite and bipartite models of the photochemical apparatus of photosynthesis. *Ciba Found. Symp.* 61, 237 - 256, Amsterdam.
 - and KITAJIMA, M. (1975 a): Fluorescence quenching in photosystem 2 of chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 376, 116 - 125.
 - and KITAJIMA, M. (1975 b): Energy transfer between photosystem 2 and photosystem 1 in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 396, 72 - 85.
- CLAYTON, R. K. (1980): *Photosynthesis: Physical mechanisms and their chemical patterns*. Cambridge.
- DANCKWORTT, P. W. und EISENBRAND, J. (1964): *Luminiszenz-Analyse im filtrierten ultravioletten Licht*. Leipzig.
- DELOSME, R. (1967): Etude de l'induction de fluorescence des algues vertes et des chloroplastes au debut d'une illumination intense. *Biochim. Biophys. Acta* 143, 108 - 128.
- (1971): New results about chlorophyll fluorescence in vivo. In: *Proc. Int. Congr. Photosynth.*, 2nd., Vol. 1 (eds. Forti, G., Avron, M. and Melandri, A.), 187 - 195, The Hague.
- DOSCHEK, W. W. and KOK, B. (1972): Photon trapping in photosystem 2 of photosynthesis. *Biophys. J.* 12, 832 - 838.
- DÜLL, R. (1974): Neuere Untersuchungen über Moose als abgestufte ökologische Indikatoren für die SO₂-Immissionen im Industriegebiet zwischen Rhein und Ruhr bei Duisburg. VDI-Kommission Reinhaltung der Luft. Düsseldorf.

- DUYSENS, L. N. M. and SWEERS, H. E. (1963): Mechanisms of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. In: Studies in microalgae and photosynthetic bacteria (ed. Japanese Society of Plant Physiol.), 353 - 372.
- ETIENNE, A. L. (1974): New results on the properties of photosystem 2 centers blocked by 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea in their different photoactive states. Biochim. Biophys. Acta 333, 320 - 330.
- FALLER, N. N. (1968): Der Schwefeldioxidgehalt der Luft als Komponente der Schwefelversorgung der Pflanze. Dissertation Universität Gießen.
- FISCHER, K., KRAMER, D. und ZIEGLER, H. (1973): Elektronenmikroskopische Untersuchungen SO_2 -begaster Blätter von *Vicia faba*. I. Beobachtungen an Chloroplasten mit akuter Schädigung. Protoplasma 76, 83 - 96.
- FORD, R. and BARBER, J. (1980): The use of diphenyl hexatriene to monitor the fluidity of the thylakoid membrane. Photochem. Photobiophys. 1, 263 - 270.
- FOYER, C. H. and HALL, D. O. (1980): Oxygen metabolism in the active chloroplast. Trends Biochem. Sci. 5, 188 - 191.
- FRAHM, J.-P. (1976): Transplantationsversuche mit epigäischen Moosen zur Eichung von Bioindikatoren für die Luftverschmutzung. Natur und Landschaft 1, 19 - 22.
- (1977): Experimentelle Untersuchungen über Moose als Indikatoren für die Luftverschmutzung. Staub-Reinh. Luft 37, 55 - 58.
- FRANCK, U. F., HOFFMANN, N., ARENZ, H., SCHREIBER, U. (1969): Chlorophyllfluoreszenz als Indikator der photochemischen Primärprozesse der Photosynthese. Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 73, 871 - 879.
- GABRYŚ, H., WALCZAK, T. and ZURZYCKI, J. (1981): Chloroplast translocations induced by light pulses. Effects of single light pulses. Planta 152, 553 - 556.
- GARAB, G., SANCHEZ BURGOS, A. A., ZIMÁNYI, L. and FALUDI-DÁNIEL, A. (1983): Effect of CO_2 on the energization of thylakoid in leaves of higher plants. FEBS Lett. 154, 323 - 327.
- GILBERT, O. L. (1968): Bryophytes as indicators of air pollution in the Tyne Valley. New Phytol. 67, 15 - 30.

- GOEDHEER, J. C. (1972): Fluorescence in relation to photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23, 87 - 112.
- GOLBECK, J. H., LIEN, S. and SAN PIETRO, A. (1977): Electron transport in chloroplasts. In: *Encycl. Plant Physiol.*, Vol. 5 (eds. Trebst, A. and Avron, M.), 94 - 116, Berlin.
- GOVINDJEE and PAPAGEORGIOU, G. (1971): Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: Fluorescence transients. In: *Photophysiology* (ed. Giese, A. C.), 1 - 44, New York.
- GUDERIAN, R. and VAN HAUT, H. (1970): Nachweis von Schwefeldioxid-Wirkungen an Pflanzen. *Staub-Reinhalt. Luft* 30, 224 - 231.
- HÄRTEL, O. und MIKLAU, S. (1971): Eine Methode zur Herstellung definierter niedriger SO₂-Spannungen. *Pfl. Krankh.* 78, 538 - 543.
- und MIKLAU-GRASSL, S. (1974): Über den Einfluß von SO₂ auf Pflanzenzellen. *Phyton* 16, 81 - 99.
- HAWORTH, P., KYLE, D. J. and ARNTZEN, C. J. (1982): A demonstration of the physiological role of membrane phosphorylation in chloroplasts using the bipartite and tripartite models of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 680, 343 - 351.
- HEATH, R. L. (1980): Initial events in injury to plants by air pollutants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31, 398 - 431.
- HENRIKSSON, E. and PEARSON, L. C. (1981): Nitrogen fixation rate and chlorophyll content of the lichen *Peltigera canina* exposed to sulfur dioxide. *Amer. J. Bot.* 68, 680 - 684.
- HENRY, L. E. A., STRASSER, R. J. and SIEGENTHALER, P.-A. (1982): Alteration in the acyl lipid composition of thylakoids induced aging and its effect on thylakoid structure. *Plant Physiol.* 69, 531 - 536.
- HERNÁNDEZ-GIL, R. and SCHAEDEL, M. (1973): Functional and structural changes in senescing *Populus deltoides* (Bartr.) chloroplasts. *Plant Physiol.* 51, 245 - 249.
- HETHERINGTON, S. E., HALLAM, N. D. and SMILLIE, R. M. (1982): Ultrastructural and compositional changes in chloroplast thylakoids of leaves of *Borya nitida* during humidity-sensitive degreening. *Aust. J. Plant Physiol.* 9, 601 - 609.

- HILLER, R. G. and GOODCHILD, D. J. (1981): Thylakoid membrane and pigment organization. In: The biochemistry of plants, Vol. 8 (eds. Hatch, M. D. and Boardman, N. K.), 2 - 47, New York.
- HODGES, M. and BARBER, J. (1983): Photosynthetic adaptation of pea plants grown at different light intensities: State 1-state 2 transitions and associated chlorophyll fluorescence changes. *Planta* 157, 166 - 173.
- HOFFMANN, N. (1967): Chlorophyllfluoreszenz und Photosynthese. Untersuchungen zum Kautsky-Effekt. Dissertation TH Aachen.
- HOLZ, H. M.: Was man von der Fluoreszenzmikroskopie wissen sollte. 2. Neub. Auflage. Carl Zeiss, Oberkochen.
- HOLZAPFEL, C. und BAUER, R. (1975): Computer simulation of primary photosynthetic reactions compared with experimental results on O₂-exchange and chlorophyll fluorescence of green plants. *Z. Naturforsch.* 30 c, 489 - 498.
- HORTON, P., ALLEN, J. F., BLACK, M. T., BENNETT, J. (1981): Regulation of phosphorylation of chloroplast membranes polypeptides by the redox state of plastoquinone. *FEBS Lett.* 125, 193 - 196.
- and BLACK, M. T. (1980): Activation of adenosine 5'triphosphate induced quenching of chlorophyll fluorescence by reduced plastoquinone. The basis of state 1-state 2 transitions in chloroplasts. *FEBS Lett.* 119, 141 - 144.
 - - (1981): Light-dependent quenching of chlorophyll fluorescence in pea chloroplasts induced by adenosine 5'-triphosphate. *Biochim. Biophys. Acta* 635, 53 - 62.
 - - (1982): On the nature of the fluorescence decrease due to phosphorylation of chloroplast membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 680, 22 - 27.
- IKEGAMI, I. and KATOH, S. (1972): Chlorophyll fluorescence in chloroplasts. I. Effects of dithionite on fluorescence of chlorophyll a in isolated spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 150, 9 - 14.
- IKEHARA, N. and NISHIMURA, M. (1973): Anion-dependent changes of energy transfer in chloroplasts. II. Relation of the coupling factor to light-induced proton transport and absorbance change at 515 nm. *Plant Cell Physiol.* 14, 77 - 90.

- JÄGER, H.-J. and KLEIN, H. (1980): Biochemical and physiological effects of SO₂ on plants. *Angew. Botanik* 54, 337 - 348.
- JAMAGISHI, A., SATOH, K. and KATOH, S. (1981): Fluorescence induction in chloroplasts isolated from the green alga *Bryopsis maxima* V. pH dependence of the P - S₁ transient. *Biochim. Biophys. Acta* 637, 264 - 271.
- JENKINS, G. I., BAKER, N. R., BRADBURY, M. and WOOLHOUSE, H. W. (1981 a): Photosynthetic electron transport during senescence of the primary leaves of *Phaseolus vulgaris* L. III. Kinetics of chlorophyll fluorescence emission from intact leaves. *J. Exp. Bot.* 32, 999 - 1008.
- BAKER, N. R. and WOOLHOUSE, H. W. (1981 b): Changes in chlorophyll content and organization during senescence of the primary leaves of *Phaseolus vulgaris* L. in relation to photosynthetic electron transport. *J. Exp. Bot.* 32, 1009 - 1020.
- JENNINGS, R. C. and FORTI, G. (1975): Fluorescence induction in intact spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 396, 63 - 71.
- JOLIOT, P., BENNOUN, P. and JOLIOT, A. (1973): New evidence supporting energy transfer between photosynthetic units. *Biochim. Biophys. Acta* 305, 317 - 328.
- JOLIOT, P. and JOLIOT, A. (1971): Studies on the quenching properties of the photosystem 2 electron acceptor. In: *Proc. Int. Congr. Photosynth.*, 2nd., Vol. 1 (eds. Forti, G., Avron, M. and Melandri, A.), 26 - 38, The Hague.
- JUNGE, W. and AUSLÄNDER, W. (1974): The electric generator in photosynthesis of green plants. I. Vectorial and protolytic properties of the electron transport chain. *Biochim. Biophys. Acta* 333, 59 - 70.
- KATOH, S. SATOH, K., YAMAGISHI, A. and YAMAOKA, T. (1975): Fluorescence induction in chloroplasts isolated from the green algae *Bryopsis maxima*. I. Occurrence of the complete Kautsky effect in *Bryopsis* chloroplasts. *Plant and Cell Physiol.* 16, 1093 - 1099.
- KAUTSKY, H. (1934): Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensäure-assimilation. II. Mitteilung. *Biochemische Zeitschrift* 274, 435 - 451.
- APPEL, W. und AMANN, H. (1960): Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensäureassimilation. *Biochemische Zeitschrift* 332, 277 - 292.

- und HIRSCH, A. (1934): Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensäureassimilation. Das Fluoreszenzverhalten grüner Pflanzen. Biochemische Zeitschrift 274, 423 - 434.
- KITAJIMA, M. and BUTLER, W. L. (1975): Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. Biochim. Biophys. Acta 376, 105 - 115.
- KJELSTAD, B. and MELÖ, T. B. (1983): Fluorescence induction in *Avena sativa* investigated by modulated light. Physiol. Plant. 59, 115 - 119.
- KLOCKARE, B., MELÖ, T. B. and JOHNSON, A. (1979): A system approach to fluorescence induction in green leaves. Physiol. Plant. 46, 101 - 108.
- KOBAYASHI, Y., INOUE, Y. and SHIBATA, K. (1975): Light-dependent fluorescence variations in intact leaves. Plant and Cell Physiol. 16, 767 - 776.
- KOUCHKOVSKY, Y. de (1975): Study of the chlorophyll fluorescence in chloroplasts and algae with the plastoquinone antagonist dibromothymoquinone. Biochim. Biophys. Acta 376, 259 - 267.
- KRAUSE, G. H. (1973): The high-energy state of the thylakoid system as indicated by chlorophyll fluorescence and chloroplast shrinkage. Biochim. Biophys. Acta 292, 715 - 728.
- (1974): Changes in chlorophyll fluorescence in relation to light-dependent cation transfer across thylakoid membranes. Biochim. Biophys. Acta 333, 301 - 313.
- (1977): Light induced movement of magnesium ions in intact chloroplasts. Spectroscopic determination with Eriochrome Blue SE. Biochim. Biophys. Acta 460, 500 - 510.
- BRIANTAIS, J.-M., VERNOTTE, C. (1981): Two mechanisms of reversible fluorescence quenching in chloroplasts. In: Proc. Int. Congr. Photosynth., 5th., Vol. 1 (ed. Akoyunoglou, G.), 575 - 584, Philadelphia, Pa.
- -, - (1983): Characterization of chlorophyll fluorescence quenching in chloroplasts by fluorescence spectroscopy at 77 K. Biochim. Biophys. Acta 723, 169 - 175.
- and SANTARIUS, K. A. (1975): Relative thermostability of the chloroplast envelope. Planta 127, 285 - 299.

- KREEB, K. H. (1971): Ökophysiologie natürlicher Streßwirkungen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 84, 485 - 496.
- (1977): Methoden der Pflanzenökologie. Jena.
 - SCHWEGLER, H., MÜLLER, J., SCHIELE, S., SCHNEIDER, K. und WEINMANN, R. (1981): Zur Anwendung der "Katastrophen-theorie" für die Modellbildung im Bereich der Bioindikation: Vergleich der Organisationsebenen "Vegetation" und "Chloroplasten". Angew. Botanik 55, 149 - 167.
- KYLE, D. J., HAWORTH, P. and ARNTZEN, C. J. (1982): Thylakoid membrane protein phosphorylation leads to a decrease in connectivity between photosystem 2 reaction centers. Biochim. Biophys. Acta 680, 336 - 342.
- STAEHELIN, L. A. and ARNTZEN, C. J. (1983): Lateral mobility of the light-harvesting complex in chloroplast membranes controls excitation energy distribution in higher plants. Arch. Biochem. Biophys. 222, 527 - 541.
- LAVERGNE, J. (1974): Fluorescence induction in algae and chloroplasts. Photochem. Photobiol. 20, 377 - 386.
- LAVOREL, J. (1959): Induction of fluorescence in quinone poisoned Chlorella cells. Plant Physiol. 34, 204 - 209.
- (1973): Kinetics of luminiscence in the 10^{-6} - 10^{-4} s range in Chlorella. Biochim. Biophys. Acta 325, 213-229.
 - and ETIENNE, A.-L. (1977): In vivo chlorophyll fluorescence. In: Primary processes of photosynthesis, Vol. 2 (ed. Barber, J.), 205 - 268, Amsterdam.
 - and JOLIOT, P. (1972): A connected model of the photosynthetic unit. Biophys. J. 12, 815 - 831.
- LEBLANC, F. and DESSLOOVER, J. (1970): Relation between industrialization and the distribution and growth of epiphytic lichens and mosses in Montreal. Can. J. Bot. 48, 1485 - 1496.
- LEMOINE, Y. et JUPIN, H. (1978): Analyse cinétique et spectroscopique de la fluorescence chez un mutant photosensible de Tabac. Photosynthetica 12, 35 - 50.
- LIBERA, W., ZIEGLER, H., ZIEGLER, I. (1973): Förderung der Hill-Reaktion und der CO_2 -Fixierung in isolierten Spinat-chloroplasten durch niedere Sulfitkonzentrationen. Planta 109, 269 - 279.

- ZIEGLER, I., ZIEGLER, H. (1975): The action of sulfite on the HCO_3 -fixation and the fixation pattern of isolated chloroplasts and leaf tissue slices. *Z. Pflanzenphysiol.* 74, 420 - 433.
- LJUBEŠIĆ, N. (1968): Der Feinbau des Chloroplasten während der Vergilbung und Wiederergrünung der Blätter. *Protoplasma* 66, 369 - 379.
- MALHOTRA, S. S. (1976): Effects of sulphur dioxide on biochemical activity and ultrastructural organization of pine needle chloroplasts. *New Phytol.* 76, 239 - 245.
- MALKIN, S. and KOK, B. (1966): Fluorescence induction studies in isolated chloroplasts. I. Number of components involved in the reaction and quantum yield. *Biochim. Biophys. Acta* 126, 413 - 432.
- MARKWELL, J. P., BAKER, N. R. and THORNER, J. P. (1982): Metabolic regulation of the thylakoid protein kinase. *FEBS Lett.* 142, 171 - 174.
- MATHIES, P. and PAILLOTIN, G. (1981): Primary processes of photosynthesis. In: *The biochemistry of plants*, Vol. 8 (eds. Stumpf, P. K. and Conn, E. E.), 98 - 155, New York.
- MELIS, A. and DUYSSENS, L. N. M. (1979): Biphasic energy conversion kinetics and absorbance difference spectra of photosystem 2 of chloroplasts. Evidence for two different photosystem 2 reaction centers. *Photochem. Photobiol.* 29, 373 - 382.
- MOHANTY, P. and GOVINDJEE (1974): The slow decline and subsequent use of chlorophyll fluorescence transients in intact algae cells. *Plant Biochem. J.* 1, 78 - 106.
- PAPAGEORGIOU, G. and GOVINDJEE (1971): Fluorescence induction in the red alga *Porphyridium cruentum*. *Photochem. Photobiol.* 14, 667 - 682.
- MOHR, H. und SCHOPFER, P. (1978): *Lehrbuch der Pflanzenphysiologie*. Berlin.
- MORIN, P. (1964): Kinetics of fluorescence of chlorophyll in vivo in the first instants after the beginning of illumination. *J. Chim. Phys.* 61, 674 - 680.
- MÜLLER, J. (1981): Experimentell-ökologische Untersuchungen zum Flechtenvorkommen auf Bäumen an naturnahen Standorten. Dissertation Universität Bremen.
- MÜLLER, N. J. C. (1874): Beziehungen zwischen Assimilation, Absorption und Fluoreszenz im Chlorophyll des lebenden Blattes. In: *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik* 9, 42 - 49 (ed. Pringsheim, N.), Leipzig.

- (1880): Handbuch der Botanik, Bd. 1, Heidelberg.
- MUNDAY JR., J. C. and GOVINDJEE (1969): Fluorescence transients in *Chlorella*: Effects of supplementary light, anaerobiosis and methylviologen. In: Progr. Photos. Res., Vol. 2 (ed. Metzner, H.), 913 - 922, Tübingen.
- - (1969 a): Light-induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll a in vivo. III. The dip and the peak in the fluorescence transient of *Chlorella pyrenoidosa*. Biophys. J. 9, 1 - 21.
 - - (1969 b): Light-induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll a in vivo. IV. The effect of preillumination of the fluorescence transient of *Chlorella pyrenoidosa*. Biophys. J. 9, 22 - 35.
- MURATA, N. (1969): Control of excitation transfer in photosynthesis. I. Light-induced change of chlorophyll a fluorescence in *Porphyridium cruentum*. Biochim. Biophys. Acta 172, 242 - 251.
- NISHIMURA, M. and TAKAMIYA, A. (1966): Fluorescence of chlorophyll in photosynthetic systems. II. Introduction of fluorescence in isolated spinach. Biochim. Biophys. Acta 120, 23 - 33.
- ÖQUIST, G. and HELLGREN, N. O. (1976): The photosynthetic electron transport capacity of chloroplasts prepared from seedlings of unhardened and hardened seedlings of *Prunus silvestris*. Plant Sci. Lett. 7, 359 - 369.
- PAILLLOTIN, G. (1976): Movement of excitations in the photosynthetic domains of photosystem 2. J. Theor. Biol. 58, 237 - 252.
- PAPAGEORGIOU, G. (1975): Chlorophyll fluorescence: An intrinsic probe of photosynthesis. In: Bioenergetics of photosynthesis (ed. Govindjee), 319 - 371, New York.
- PEARCY, R. W., BERRY, J. A. and FORK, D. C. (1977): Effect of growth temperature on the thermal stability of the photosynthetic apparatus of *Atriplex lentiformis* (Torr.) Wats. Plant Physiol. 59, 873 - 878.
- PEISER, G. D., LIZADA, M. C. C. and YANG, S. F. (1982): Sulfite-induced lipid peroxidation in chloroplasts as determined by ethane production. Plant Physiol. 70, 994 - 998.

- PFISTER, K. (1977): Untersuchungen über den Einfluß von halogenierten Naphtochinonen auf den photosynthetischen Elektronentransport und auf die Chlorophyllfluoreszenz des Photosyntheseapparates. Dissertation Universität Karlsruhe.
- and ARNTZEN, C. J. (1979): The mode of action of photosystem 2-specific inhibitors in herbicide-resistant weed biotypes. Z. Naturforsch. 34 c, 996 - 1009.
 - and LICHTENTHALER, H. K. (1981): The inhibition of photosynthetic light reactions by halogenated naphtoquinones. Z. Naturforsch. 36 c, 645 - 655.
 - - BURGER, G., MUSSO, H. und ZAHN, M. (1981): The inhibition of photosynthetic light reactions by halogenated naphtoquinones. Z. Naturforsch. 36 c, 645 - 655.
- PILLER, H. (1977): Microscope photometry. Berlin.
- PORTIS JR., A. R. HELDT, H. W. (1976): Light-dependent changes of the Mg^{2+} concentration in the stroma in relation to the Mg^{2+} dependency of CO_2 fixation in intact chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 449, 434 - 446.
- PUCKETT, K. J., NIEBOER, E., FLORA, W. P. and RICHARDSON, D. H. S. (1973): Sulphur dioxide: Its effect on photosynthetic ^{14}C fixation in lichens and suggested mechanisms of phytotoxicity. New Phytol. 72, 141 - 154.
- RABE, R. (1978): Bioindikation von Luftverunreinigungen aufgrund der Änderung von Enzymaktivität und Chlorophyllgehalt von Testpflanzen. Dissertation Universität Hohenheim.
- RABINOVICH, H. D. and FRIDOVICH, I. (1983): Superoxide radicals, superoxide dismutases and oxygen toxicity in plants. Photochem. Photobiol. 37, 679 - 690.
- RABINOWITCH, E. and GOVINDJEE (1969): Photosynthesis. New York.
- RADMER, R. and KOK, B. (1973): A kinetic analysis of the oxidizing and reducing sides of the O_2 -evolving system of photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta 314, 28 - 41.
- RAO, D. N. and LEBLANC, F. (1965): Effects of sulfur dioxide on the lichen alga, with special reference to chlorophyll. Bryologist 69, 69 - 75.
- RENGER, G. (1977): Photobiophysik. In: Biophysik (eds. Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H., Ziegler, H.), 415 - 441, Berlin.

- (1979): Studies about the mechanism of herbicidal interaction with photosystem 2 in isolated chloroplasts. Z. Naturforsch. 34 c, 1010 - 1014.
- RUCH, F. and LEHMANN, U. (1973): Cytofluorometry. In: Molecular biology, biochemistry and biophysics, Vol. 14 (ed. Neuhoﬀ, V.), 329 - 346, Berlin.
- RUCH, F. und TRAPP, L. (1973): Ein Mikroskop-Fluorometer mit Kurzzeitanregung und Schaltfolgesteuerung. Zeiss Information 20, 59 - 60.
- SAKAKI, T., KONDO, N. and SUGAHARA, K. (1983): Breakdown of photosynthetic pigments and lipids in spinach leaves with ozone fumigation: Role of active oxygens. Physiol. Plant. 59, 28 - 34.
- SANTARIUS, K. A. (1980): Membrane lipids in heat injury of spinach chloroplasts. Physiol. Plant. 49, 1 - 6.
- SCHIELE, S., WEINMANN, R. und KREEB, K. H. (1981): Einige charakteristische Merkmale der Chloroplastenfluoreszenz und ihre Anwendung zur Kennzeichnung SO₂-geschädigter Moose und Tabakblätter. Angew. Botanik 55, 167 - 177.
- SCHLEE, D. (1977): Biochemische Grundlagen einer Bioindikation, betrachtet am Beispiel der SO₂-Indikation mittels Flechten. Biol. Rdsch. 15, 280 - 287.
- SCHREIBER, U. (1971): Der Einfluß des Sauerstoffs auf die Chlorophyllfluoreszenzänderungen in der lebenden Pflanze. Untersuchungen zum Kautsky-Effekt. Dissertation TH. Aachen.
- and ARMOND, A. (1978): Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in isolated chloroplasts and related heat-damage at the pigment level. Biochim. Biophys. Acta 502, 138 - 151.
- and BERRY, J. A. (1977): Heat induced changes of chlorophyll fluorescence in intact leaves, correlated with damage of the photosynthetic apparatus. Planta 136, 233 - 238.
- FINK, R. and VIDAVER, W. (1977): Fluorescence induction in whole leaves: Differentiation between the two leaf sides and adaptation to different light regimes. Planta 133, 121 - 129.
- and VIDAVER, W. (1974): Chlorophyll fluorescence induction in anaerobic *Scenedesmus obliquus*. Biochim Biophys. Acta 368, 97 - 112.
- - (1976 a): Rapid light-induced changes of energy distribution between photosystem 1 and 2. FEBS Lett. 62, 194 - 197.

- - (1976 b): The I - D fluorescence transient: An indicator of rapid energy distribution changes in photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 440, 205 - 214.
- SCHWEGLER, H. (1981): Structure and organization of biological systems. In: *Selforganizing systems* (eds. Roth, G. and Schwegler, H.), 24 - 38, Frankfurt.
- SEITZ, K. (1970): Über den Mechanismus der lichtinduzierten Orientierungsbewegung der Chloroplasten. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 83, 193 - 198.
- ŠESTÁK, Z. (1979): Changes in activities of photosystems during leaf ontogenesis. In: *Photosynthesis and plant development* (eds. Marcelle, R., Clijsters, H. and Van Poncke, M.), 21 - 29, The Hague.
- SHIMAZAKI, K., SAKAKI, T., KONDO, N. and SUGAHARA, K. (1980): Active oxygen participation in chlorophyll destruction and lipid peroxidation in SO₂-fumigated leaves of spinach. *Plant and Cell Physiol.* 21, 1193 - 1204.
- and SUGAHARA, K. (1979): Specific inhibition of photosystem 2 activity in chloroplasts by fumigation of spinach leaves with SO₂. *Plant and Cell Physiol.* 20, 947 - 955.
- - (1980): Inhibition site of the electron transport system in lettuce chloroplasts by fumigation of leaves with SO₂. *Plant and Cell Physiol.* 21, 125 - 135.
- SINGER, S. J. and NICOLSON, G. L. (1972): The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720 - 731.
- SLOVACEK, R. E. and BANNISTER, T. T. (1973): The effects of carbon dioxide concentration on oxygen evolution and fluorescence transients in synchronous cultures of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim. Biophys. Acta* 292, 729 - 740.
- SMILLIE, R. M. and HETHERINGTON, S. E. (1983): Stress tolerance and stress-induced injury in crop plants measured by chlorophyll fluorescence in vivo. *Plant Physiol.* 72, 1043 - 1050.
- SOKOLOVE, P. M. and MARSHO, T. V. (1977): Slow fluorescence quenching of type A chloroplasts. Relationship to electron flow with CO₂ as acceptor. *FEBS Lett.* 75, 28 - 32.
- SPIEGEL, M. R. (1961): *Statistics*. New York.

- STAEHELIN, L. A. (1976): Reversible particle movements associated with unstacking and restacking of chloroplast membranes in vitro. *Journal of Cell Biology* 71, 136 - 158.
- and ARNTZEN, C. J. (1979): Effects of ions and gravity forces on the supramolecular organization and excitation energy distribution in chloroplast membranes. In: *Chlorophyll organization and energy transfer in photosynthesis*, Ciba Found. Symp. 61, 237 - 252, Amsterdam.
 - KYLE, D. J. and ARNTZEN, C. J. (1982): Spillover is mediated by reversible migration of LHCP between grana and stroma thylakoids. *Plant Physiol.* 69, Supplement, Nr. 386.
- STEINBACK, K.E., BURKE, J. J. and ARNTZEN, C. J. (1979): Evidence for the role of surface-exposed segments of the light-harvesting complex in cation-mediated control of chloroplast structure and function. *Arch. Biochem. Biophys.* 195, 546 - 557.
- STUEBING, L. (1975): Niedere und höhere Pflanzen als Indikatoren für Immissionsbelastungen. *Daten und Dokumente zum Umweltschutz* 14, 13 - 28.
- SUNDBOM, E. and ÖQUIST, G. (1982): Temperature-induced changes of variable fluorescence-yield in intact leaves. *Plant and Cell Physiol.* 23, 1161 - 1167.
- TANAKA, K. and SUGAHARA, K. (1980): Role of superoxide dismutase in defense against SO_2 toxicity and an increase in superoxide dismutase activity with SO_2 fumigation. *Plant and Cell Physiol.* 21, 601 - 611.
- TANAKA, K., KONDO, N. and SUGAHARA, K. (1982): Accumulation of hydrogen peroxide in chloroplasts of SO_2 -fumigated spinach leaves. *Plant and Cell Physiol.* 23, 999 - 1007.
- TELFER, A. and BARBER, J. (1981): ATP dependent state 1-state 2 changes in isolated pea thylakoids. *FEBS Lett.* 129, 161 - 165.
- TELFER, A., HODGES, M. and BARBER, J. (1983): Analysis of chlorophyll fluorescence induction curves in the presence of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea as a function of magnesium concentration and NADPH-activated light-harvesting chlorophyll a/b protein phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 724, 167 - 175.
- THOMAS, H. (1977): Ultrastructure, polypeptide composition and photochemical activity of chloroplasts during foliar senescence of a non-yellowing mutant genotype of *Festuca pratensis* Huds. *Planta* 137, 53 - 60.

- and STODDART, J. L. (1980): Leaf senescence. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31, 83 - 111.

- THORNER, J. P. (1975): Chlorophyll-proteins light-harvesting and reaction centre components of plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26, 127 - 158.

- and BARBER, J. (1979): Photosynthetic pigments and models for their organization in vivo. In: *Photosynthesis in relation to model system*, Vol. 3 (ed. Barber, J.), 27 - 70, Amsterdam.

- and HIGHKIN, H. R. (1974): Composition of the photosynthetic apparatus of normal barley leaves and a mutant lacking chlorophyll b. *Eur. J. Biochem.* 41, 109 - 116.

- THORNE, S. W. and BOARDMAN, N. K. (1971): The effect of temperature on the fluorescence kinetics of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 234, 113 - 125.

- VAN GORKOM, H. J. (1977): Identification of the reduced primary electron acceptor of photosystem 2 as a bound semiquinone anion. *Biochim. Biophys. Acta* 347, 439 - 442.

- VAN HAUT, H. und STRATMANN, H. (1969): *Farbtafelatlas über Schwefeldioxidwirkungen an Pflanzen*. Essen.

- VELTHUYS, B. R. and AMESZ, J. (1973): The effect of dithionite on fluorescence and luminiscence of chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 325, 126 - 137.

- VERNOTTE, C., BRIANTAIS, J. M., ARMOND, P. and ARNTZEN, C. J. (1975): Preillumination effects on chloroplast structure and photochemical activity. *Plant Sci. Lett.* 4, 115 - 123.

- VERNOTTE, C., ETIENNE, A. L. and BRIANTAIS, J. M. (1979): Quenching of the system 2 chlorophyll fluorescence by the plastoquinone pool. *Biochim. Biophys. Acta* 545, 519 - 527.

- WALKER, D. A. (1981): Secondary fluorescence kinetics of spinach leaves in relation to the onset of photosynthetic carbon assimilation. *Planta* 153, 273 - 278.

- WALZ, D., GOLDSTEIN, L. and AVRON, M. (1974): Determination and analysis of the buffer capacity of isolated chloroplasts in the light and in the dark. *Eur. J. Biochem.* 47, 403 - 407.

- WELLBURN, A. R., MAJERNIK, O. and WELLBURN, F. A. M. (1972): Effects of SO₂ and NO₂ polluted air upon the ultrastructure of chloroplasts. *Environm. Pollut.* 3, 37 - 49.

- WILLIAMS, W. P. (1977): The two photosystems and their interactions. In: Primary processes in photosynthesis, Vol. 2 (ed. Barber, J.), 99 - 149, Amsterdam.
- WITT, H. T. (1971): Coupling of quanta, electrons, fields, ions and phosphorylation in the functional membrane of photosynthesis. Results by pulse spectroscopic methods. Quarterly Reviews of Biophysics 4, 365 - 474.
- (1975): Primary acts of energy conservation in the functional membrane of photosynthesis. In: Bioenergetics of Photosynthesis (ed. Govindjee), 493 - 554, New York.
- WITTENBERGER, G. (1975): Moose als mögliche Bioindikatoren für Luftverschmutzung dargestellt am Beispiel von Offenbach am Main. Natur und Landschaft 5, 143 - 145.
- WOLLGIEHN, R. and PARTHIER, B. (1980): RNA and protein synthesis in plastid differentiation. In: Chloroplasts. Results and problems in cell differentiation (ed. Reinert, J.), 97 - 145, Berlin.
- WONG, C. H., KLEIN, H. and JÄGER, H.-J. (1977): The effects of SO_2 on the ultrastructure of PISUM and ZEA chloroplasts. Angew. Bot. 51, 311 - 319.
- ZEISS: Diverse Anleitungen zum Gebrauch des Photomikroskopes.
- ZIEGLER, I. and HAMPP, R. (1977): Control of $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ and $^{35}\text{SO}_3^{2-}$ incorporation into spinach chloroplasts during photosynthetic CO_2 fixation. Planta 137, 303 - 307.

